



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Βιολογίας

Τομέας Βοτανικής

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Μικροβιακή Βιοτεχνολογία

**“Μελέτη της αλληλεπίδρασης του ιού Υ της πατάτας με το φυτό-
ξενιστή πιπεριά”**

Επιβλέπων Καθηγητής

Δημήτριος Χατζηνικολάου, Επίκουρος

Συνεπιβλέπων

Νίκων Βασιλάκος, Ερευνητής Β΄

Κωνσταντίνος Κωτσαρίδης

Αθήνα 2018

Πίνακας περιεχομένων

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	5
1.1 Οι ιοί των φυτών και σύγχρονες προκλήσεις	6
1.2 Το γένος <i>Potyvirus</i> και ο ιός Υ της πατάτας.....	7
1.2.1 Τρόποι μετάδοσης και συμπτωματολογία του PVY.....	8
1.2.2 Γονιδιωματική οργάνωση και πρωτεϊνικές λειτουργίες	9
1.2.3 Αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος	12
1.2.4 Μετάφραση του ιϊκού γονιδιώματος.....	13
1.3 Οι πρωτεΐνες P3 και P3N-PIPO	16
1.4 Διακυτταρική μετακίνηση των ιών του γένους <i>Potyvirus</i>	19
1.5 Αλληλεπιδράσεις της P3N-PIPO με φυτικές πρωτεΐνες	21
1.6 Γενετική ανθεκτικότητα στους ιούς του γένους <i>Potyvirus</i>	24
1.7 Επαγωγή σίγησης γονιδίων μέσω του ιϊκού φορέα του ιού του κροταλίσματος του καπνού (<i>Tobacco rattle virus</i> , TRV)	26
1.8 Εξέλιξη και προσαρμοστικότητα των φυτικών ιών.....	28
1.8.1 Στάδια εμφάνισης φυτικών ιών σε νέα φυτά-ξενιστές	28
1.8.2 Προσαρμογή και αλλαγή νέων φυτών-ξενιστών	29
1.8.3 Προσαρμογή και εύρος-ξενιστών του ιού PVY	30
1.9 Στόχος της παρούσας εργασίας	31
Κεφάλαιο 2. Υλικά και μέθοδοι	33
2.1 Φυτικό υλικό και ιικές απομονώσεις.....	34
2.2 Μηχανικές μολύνσεις και συνθήκες ανάπτυξης των φυτών	35
2.3 Έλεγχος των ιϊκών μολύνσεων	35
2.4 Εξαγωγή ολικού φυτικού RNA	37
2.5 Πέψη με DNase	38
2.6 Αντίστροφη μεταγραφή	39
2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	41
2.7.1. Ενίσχυση της πλήρους αλληλουχίας του γονιδίου <i>PCaP1</i>	42
2.7.2. Ενίσχυση τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου <i>PCaP1</i> για χρήση VIGS και των περιοχών που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες CP και P3 του PVY-SON41 για την ετερόλογη έκφρασή τους μέσω ιϊκού φορέα	43
2.8 PCR αλληλοεπικαλυπτόμενης επέκτασης (Overlap extension PCR, OE-PCR).....	44
2.9 Ηλεκτροφόρηση DNA	46
2.10 Ποσοτική-πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative-real time PCR, qPCR).....	47
2.10.1 Ποσοτικοποίηση των μεταγράφων του γονιδίου <i>PCaP1</i> και της PVY-SON41- P3... ..	48
2.11 Καθαρισμός προϊόντος PCR	49

2.12 Αντίδραση λιγάσης και κλωνοποίηση σε φορέα pCR® II-TOPO®	50
2.13 Προετοιμασία κυττάρων <i>Escherichia coli</i> για ηλεκτροδιάτρηση	52
2.14 Μετασχηματισμός <i>E. coli</i> με ηλεκτροδιάτρηση	52
2.15 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>E. coli</i>	54
2.16 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	55
2.17 Μεταγραφή <i>in vitro</i>	56
2.18 Διαδικασία μετασχηματισμού ιϊκού φορέα	58
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα	59
3.1 Αναγνώριση της ορθόλογης PCaP1 πρωτεΐνης στη πιπεριά.....	60
3.2 Διερεύνηση διαφορών στην αμινοξική αλληλουχία της PCaP1 σε ποικιλίες πιπεριάς με διαφορική ευπάθεια σε απομονώσεις του PVY	61
3.3 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών μέσω του φορέα TRV-PpK20	64
3.3.1 Έκφραση της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVY-SON41.....	64
3.3.2 Δημιουργία VIGS κατασκευής για το γονίδιο PCaP1	66
3.3.3 Διερεύνηση της επίδρασης της σίγησης του γονιδίου PCaP1 στη μετακίνηση της απομόνωσης PVY-SON41	69
3.3.3.1 Επίδραση σε διασυστηματικό επίπεδο.....	69
3.3.3.2 Μελέτη της επίδρασης σε διασυστηματικό επίπεδο και στα φύλλα που έγινε η μόλυνση (τοπικό επίπεδο)	70
3.4 Σημειακή μεταλλαγή στην αλληλουχία της P3 περιοχής του PVY-SON41 για τη δημιουργία της P3N-PIPO	74
Κεφάλαιο 4. Συμπεράσματα-Συζήτηση	78
Κεφάλαιο 5. Βιβλιογραφία	83

Κεφάλαιο 1.

Εισαγωγή

1.1 Οι ιοί των φυτών και σύγχρονες προκλήσεις

Η απαρχή της ιολογίας των φυτών τοποθετείται στο τέλος του 19^{ου} αιώνα, όπου οι Martinus Beijerinck και Dmitrii Iwanowski ερευνούσαν μία ασθένεια του καπνού (Scholthof, 2001). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές περιέγραψαν έναν μη συνηθισμένο παράγοντα, ο οποίος είχε την ικανότητα να προκαλεί συμπτώματα μωσαϊκού στον καπνό. Το χαρακτηριστικό που διαφοροποιούσε τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό από τα υπόλοιπα είδη των, μέχρι τότε γνωστών μικροβίων, ήταν το συγκριτικά πολύ μικρό του μέγεθος. Ο συγκεκριμένος μολυσματικός παράγοντας αργότερα ονομάστηκε ιός του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Από τότε, ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών ιών έχουν ταυτοποιηθεί και περιγραφεί, σε όλο το εύρος των οργανισμών-ξενιστών (Gergerich and Dolja, 2006). Σήμερα, υπολογίζεται πως ο συνολικός αριθμός των καταγεγραμμένων ιών ανέρχεται στις 4.000, από τους οποίους οι 1,000 είναι φυτικοί ιοί (King et al., 2012). Οι ιοί δεν αποτελούν απλά μία ακόμα ομάδα των παθογόνων, αλλά μία παντελώς διαφορετική μορφή ζωής. Σε αυτό συντελεί το γεγονός πως παραμένουν ανενεργοί εκτός του οργανισμού-ξενιστή τους, ενώ πολλαπλασιάζονται εντός μολυσμένων κυττάρων, δημιουργώντας μία συσσώρευση των δομικών συστατικών τους. Συμπερασματικά, και λαμβάνοντας υπόψη την έλλειψη ικανότητας τους ως προς τη σύνθεση πρωτεϊνών και την παραγωγή ενέργειας, οι ιοί αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα, καθιστώντας αδύνατη την καλλιέργειά τους σε οποιοδήποτε μέσο ανάπτυξης.

Έρευνες με αντικείμενο τις αλληλεπιδράσεις των φυτικών ιών με τους ξενιστές τους, έχουν αναδείξει τους ιούς ως ένα πολύτιμο εργαλείο στην βιοτεχνολογία και στην παραγωγή φαρμάκων. Για παράδειγμα οι φυτικοί ιοί χρησιμοποιούνται πλέον στην παραγωγή πρωτεϊνών του ενδιαφέροντος μας από φυτικούς οργανισμούς (Pogue et al., 2002), καθώς και στην παραγωγή φτηνών και μη επικίνδυνων για τον άνθρωπο εμβολίων έναντι σε ζωικούς και ανθρώπινους ιούς (Walmsley and Arntzen, 2000).

Εντούτοις, κυρίαρχος λόγος μελέτης των φυτικών ιών είναι η ζημία που επιφέρουν στην αγροτική οικονομία. Επιπλέον, οι περιβαλλοντικές αλλαγές, κυρίως με την αύξηση της θερμοκρασίας και της περιεκτικότητας της ατμόσφαιρας σε διοξείδιο του άνθρακα, έχουν επιφέρει σημαντικές αλλαγές στη φυσιολογία, τη μορφολογία και το μεταβολισμό των φυτών καθώς και στα επίπεδα των διαθέσιμων θρεπτικών στοιχείων

(Canto et al, 2009, Jones and Barbetti, 2012). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιδεκτικότητας τους σε ασθένειες, μεταξύ αυτών και ιολογικές. Η άμυνα των φυτών έναντι των ιών σχετίζεται με μηχανισμούς εξαρτώμενους από τη θερμοκρασία ενώ οι περιβαλλοντικές αλλαγές επηρεάζουν άμεσα τον βιολογικό κύκλο των ιών, καθώς μπορούν να μεταβάλλουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, τη διασυστηματική μετακίνηση στα φυτά και την εξελικτική τους δυναμική. Πολύ σημαντική είναι η επίδραση των περιβαλλοντικών μεταβολών και στη συμπεριφορά των εντόμων φορέων των ιών με δραματικές συνέπειες στη διασπορά τους τόσο στο χώρο όσο και σε νέους ξενιστές (Jones, 2016). Συνεπώς, η αύξηση της εμφάνισης νέων απομονώσεων ιών με διευρυμένο πεδίο ξενιστών ή/και φορέων μετάδοσης είναι ένας υπαρκτός κίνδυνος που χρήζει άμεσης μελέτης και ανάπτυξης τρόπων αντιμετώπισης.

1.2 Το γένος *Potyvirus* και ο ιός Y της πατάτας

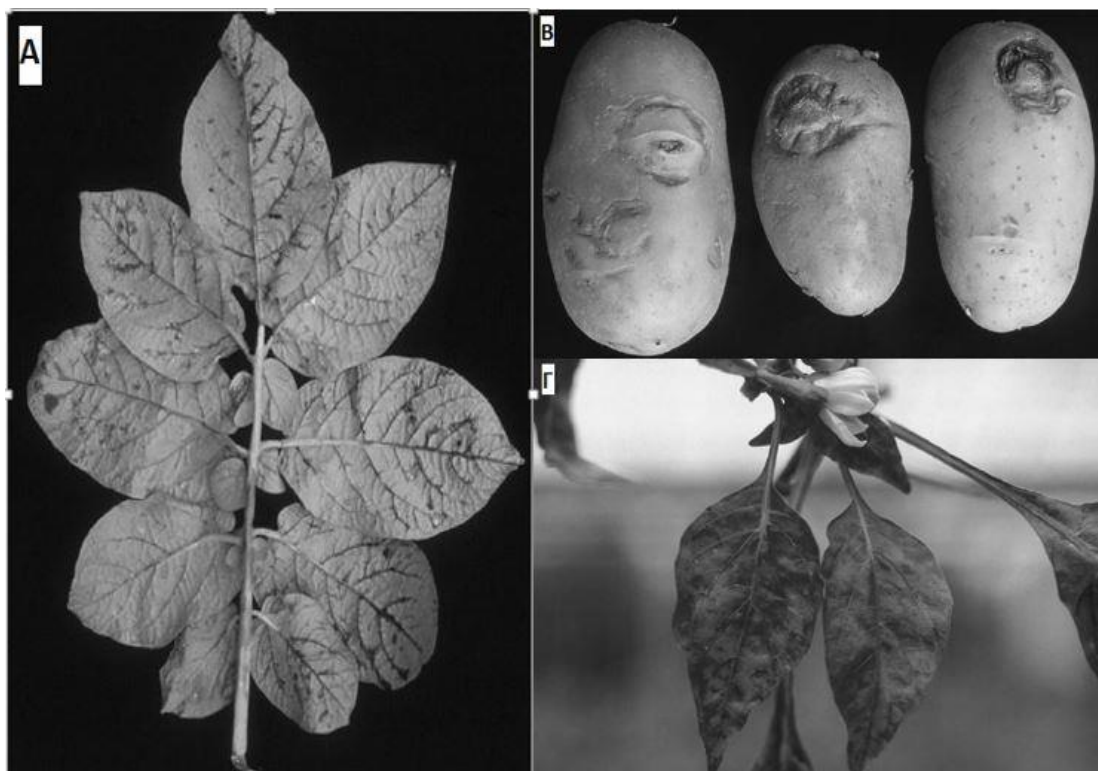
Το γένος *Potyvirus* με αντιπροσωπευτικό μέλος τον ιό Y της πατάτας (*Potato virus Y*, PVY) προσμετρά τουλάχιστον 180 μέλη και αποτελεί το 30% των γνωστών φυτικών ιών. Οι ιοί που ανήκουν στο γένος αυτό μολύνουν ένα μεγάλο εύρος μονοκοτυλήδων και δικοτυλήδων φυτικών ειδών και προκαλούν σοβαρές ασθένειες μειώνοντας την ποιότητα και ποσότητα των αγροτικών προϊόντων με μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις. Στη φύση μεταδίδονται μέσω ενός μεγάλου αριθμού ειδών αφίδων-φορέων με μη έμμονο τρόπο. Ο PVY αποτελεί την αιτία σημαντικών απωλειών σε καλλιέργειες πατάτας παγκοσμίως, και δευτερευόντως τομάτας, πιπεριάς και καπνού και συμπεριλαμβάνεται στη λίστα των 10 σημαντικότερων φυτικών ιών (Scholthof et al., 2011). Όλοι οι ιοί-μέλη του γένους αποτελούνται από νηματοειδή σωματίδια, μήκους 650-900nm και με διάμετρο 11-15nm. Ο PVY, φυλογενετικά απαρτίζεται από τις ομάδες C1, C2, N, O και Chile.

1.2.1 Τρόποι μετάδοσης και συμπτωματολογία του PVY

Περισσότερα από 40 είδη αφίδων συμμετέχουν στη μετάδοση του PVY (*Edwardson and Christie, 1997*). Η διαδικασία της μόλυνσης ενός νέου φυτού μέσω αφίδων είναι ταχεία, καθώς λίγα λεπτά είναι αρκετά για τη μετάδοση, ενώ δεν απαιτείται λανθάνουσα κατάσταση εκ μέρους του ιού, ώστε να μπορέσει ο τελευταίος να μεταδοθεί σε έναν υγιή φυτικό οργανισμό. Το είδος *Myzus persicae* είναι ο αποτελεσματικότερος φορέας του PVY, και λαμβάνοντας υπόψη τη γεωγραφική του κατανομή, είναι υπεύθυνο για την ευρεία διάδοση του ιού.

Ο PVY είναι η κύρια ιϊκή απειλή στην καλλιέργεια της πατάτας επηρεάζοντας τόσο την απόδοση όσο και την ποιότητα του κονδύλου, με αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης έως 80% (*DeBokx and Huttinga, 1981*). Τα συμπτώματα που εμφανίζονται στην πατάτα εξαιτίας της μόλυνσής από τον PVY, εξαρτώνται από την απομόνωση του ιού, την ποικιλία του ξενιστή, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τη φύση της μετάδοσης του ιού, δηλαδή αν προέκυψε μέσω αφίδων (οριζόντια μετάδοση) ή από μολυσμένους κονδύλους (κάθετη μετάδοση) (*Draper et al., 2002*). Τα συμπτώματα στο υπέργειο μέρος της πατάτας συμπεριλαμβάνουν σχηματισμούς μωσαϊκού, κηλιδώσεων και πτυχώσεων στα φύλλα, καθώς επίσης και νεκρώσεις στις νευρώσεις των τελευταίων (**Εικόνα 1.1.A**), ενώ στην περίπτωση μόλυνσης από τους κονδύλους παρατηρούνται νεκρωτικές κηλίδες, νεκρώσεις του μίσχου των φύλλων, και νανισμός των φυτών. Η μόλυνση του φυτού από συγκεκριμένες απομονώσεις του PVY προκαλεί τη νόσο της νεκρωτικής δακτυλιωτής κηλίδωσης των κονδύλων, η οποία χαρακτηρίζεται από επιφανειακούς δακτυλιοειδείς σχηματισμούς ή σχηματισμούς τόξου, οι οποίοι εξέρχουν από την επιφάνειά του (*Kerlan, 2006*) (**Εικόνα 1.1.B**).

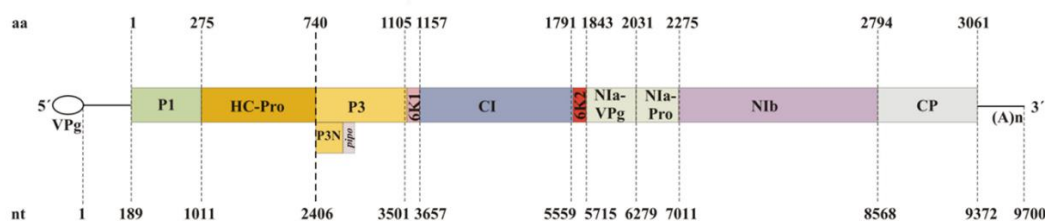
Τα συμπτώματα της μόλυνσης στον καπνό, στην τομάτα και την πιπεριά συνίστανται στην εμφάνιση ήπιας κηλίδωσης και τον σχηματισμό μωσαϊκού στα φύλλα (**Εικόνα 1.1.Γ**). Επιπλέον στον καπνό, ο PVY, έχει την ικανότητα να τροποποιεί τη χημική σύσταση των φύλλων του φυτού, ειδικά στο περιεχόμενο τους σε νικοτίνη (*Latorre et al., 1984*), το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα σημαντικές οικονομικές απώλειες. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν παρατηρηθεί στην περιοχή της Μεσογείου, νεκρώσεις φύλλων και μίσχου ως συμπτώματα μολύνσεων του PVY σε καλλιέργειες τομάτας και πιπεριάς (*Fanigliulo et al., 2005*).



Εικ. 1.1. Συμπτώματα μολύνσεων από PVY. (Α) Νεκρώσεις των νευρώσεων των φύλλων της πατάτας. (Β) Νεκρωτικές δακτυλιωτές κηλιδώσεις σε βολβό πατάτας. (Γ) Σχηματισμός μωσαϊκού σε φύλλο πιπεριάς (Quenouille *et al.*, 2013).

1.2.2 Γονιδιωματική οργάνωση και πρωτεϊνικές λειτουργίες

Το γονιδίωμα του PVY, αποτελείται από ένα γραμμικό μόριο RNA, μήκους 9.700 νουκλεοτιδίων, το οποίο κωδικοποιεί ένα (πολυπρωτεϊνικό) πρόδρομο μετάγραφο που ωριμάζει και κωδικοποιεί για 11 πρωτεΐνες: P1, HC-Pro, CI, NIa-Pro, Nib, VPg, 6K1, 6K2, CP, P3 και P3N-PIPO (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001, Quenouille *et al.*, 2013) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης του γονιδιώματος του ιού Y της πατάτας (*Potato Virus Y*, PVY), αντιπροσωπευτικού μέλους του γένους *Potyvirus*, και των πρωτεϊνών που κωδικοποιεί.

Η υψηλή ομοιότητα που παρουσιάζουν τα γονιδιώματα των ιών του γένους *Potyvirus*, έχει σαν αποτέλεσμα οι λειτουργίες των πρωτεϊνών να ταυτοποιηθούν κατά ομολογία, μεταξύ των ιών-μελών της ομάδας. Οι περισσότερες εξ αυτών παρουσιάζουν ένα πλήθος λειτουργιών. Η πρώτη πρωτεΐνη, η P1, μεταφράζεται από την 5' περιοχή του γονιδιώματος του PVY και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των ιών του γένους. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη περιέχει μία περιοχή πρωτεάσης στο καρβοξυτελικό της άκρο, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα να μπορεί να αποκόπτεται μόνη της από την επόμενη πρωτεΐνη HC-Pro (helper-component protease) (Verchot *et al.*, 1991). Έχει αποδειχτεί πως η P1 έχει την ικανότητα να συνδέεται σε μονόκλωνα ή δίκλωνα RNAs (Brantley and Hunt, 1993), συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό του ιϊκού γονιδιώματος (Verchot and Carrington, 1995), και τέλος συμμετέχει στη καταστολή της άμυνας του φυτικού οργανισμού (Brigneti *et al.*, 1998).

Η επόμενη πρωτεΐνη, η HC-Pro, εμπλέκεται στη μετάδοση του ιού με αφίδες (Govier *et al.*, 1977), στον πολλαπλασιασμό του ιού, στην διακυτταρική και διασυστηματική μετακίνηση του ιού μέσα στο φυτό (Rojas *et al.*, 1997; Sáenz *et al.*, 2002) και στην ένταση των συμπτωμάτων της μόλυνσης (Sáenz *et al.*, 2002). Το καρβοξυτελικό άκρο της HC-Pro εμπλέκεται στην καταστολή της άμυνας του φυτού, η οποία βασίζεται στο μηχανισμό της RNA σίγησης, με το να προσδένεται στα siRNAs (small interference RNAs) (Varrelmann *et al.*, 2007). Επιπλέον ιδιότητες ως προς την καταστολή της φυτικής άμυνας για την καταπολέμηση των ιών, προκύπτουν από το γεγονός πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες του 20S πρωτεασώματος, το οποίο συσχετίζεται με την ιϊκή ανταπόκριση των φυτών (Jin *et al.*, 2007). Τέλος, μία πρόσφατη έρευνα κατέδειξε, την αλληλεπίδραση της HC-Pro του PVY με τον ευκαριωτικό παράγοντα έναρξης 4E (eIF4E) και της ισομορφής του

eIFiso4E, που βρίσκεται στον καπνό και στην πιπεριά, καθιστώντας την συγκεκριμένη πρωτεΐνη έναν πιθανό συνεργάτη του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης (Ala-Poikela et al., 2011).

Οι πρωτεΐνες P3 και 6K1 είναι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες των ιών του γένους *Potyvirus* (Eiamtanasate et al., 2007). Η περιγραφή της P3 ακολουθεί σε επόμενη παράγραφο. Η λειτουργία της επόμενης πρωτεΐνης 6K1 δεν έχει διευκρινιστεί (Chu et al., 1997).

Η πρωτεΐνη CI (cylindrical inclusion) είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των κυτταροπλασματικών εγκλείστων σχήματος ανεμόμυλου (pinwheel-shaped), χαρακτηριστικό γνώρισμα των μολύνσεων από το συγκεκριμένο γένος ιών (Edwardson, 1992). Η εμπλοκή της στη μόλυνση του ιού μεταξύ των κυττάρων του φυτού ξενιστή έχει αποδειχτεί (Carrington et al., 1998), ενώ η ικανότητα της να προσδένεται στα RNAs και οι, όμοιες με των RNAελικασών και ATPασών λειτουργίες της, υποδεικνύουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό του ιού (Merits et al., 1998).

Η πρωτεΐνη 6K2 έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει καθοριστικά στον πολλαπλασιασμό του ιού (Wei and Wang, 2008), καθώς είναι υπεύθυνη για σύνδεση του συμπλόκου της ιϊκής αντιγραφής στον ενδοπλασματικό δίκτυο (Schaad et al., 1997).

Η NIa (first nuclear inclusion) πρωτεΐνη αποτελείται από δύο περιοχές: την VPg και μία περιοχή πρωτεάσης, η οποία αποκόπτει τις περισσότερες ιϊκές πρωτεΐνες από το πρωταρχικό πολυπρωτεϊνικό μόριο (Carrington and Dougherty, 1987). Η VPg είναι μία ασταθής πρωτεΐνη, και αυτή η δομική της αστάθεια αποτελεί τη βάση της ικανότητας της να αλληλεπιδρά με πολλές ιϊκές και φυτικές πρωτεΐνες (Elena and Rodrigo, 2013) καθώς και της λειτουργικής της ποικιλομορφίας (Rantalainen et al., 2011). Η σύνδεση της VPg με τον φυτικό παράγοντα eIF4E αποτελεί ένα βασικό συστατικό του ιϊκού πολλαπλασιασμού, δηλαδή της αντιγραφής ή/και της μετάφρασης (Deom et al., 1997). Η VPg συναντάται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, γεγονός το οποίο εξαρτάται από την σύνδεση του με την πρωτεάση NIa ή την πρωτεΐνη 6K2. Το σύμπλοκο VPg-NIa πρωτεάσης εμφανίζεται αποκλειστικά στον πυρηνίσκο του κυττάρου-ξενιστή, ενώ το σύμπλοκο 6K2–VPg–NIa πρωτεάσης βρίσκεται μέσα σε κυστικές δομές, οι οποίες προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Jiang and Laliberte, 2011). Τέλος η VPg μόνη της

συνδέεται ομοιοπολικά με το 5' άκρο του ιϊκού RNA, μέσω ενός αμινοξέος τυροσίνης (Murphy *et al.*, 1990).

Η πρωτεΐνη NIb (second nuclear inclusion) είναι μία RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp), η οποία συμμετέχει στην αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος (Hong and Hunt, 1996). Τέλος η καψιδιακή πρωτεΐνη (capsid protein, CP) απαιτείται για την συγκρότηση του ιϊκού σωματιδίου μέσα στο κύτταρο-ξενιστή, τη διασυστηματική (Dolja *et al.*, 1995) και διακυταρική μετακίνηση (Rojas *et al.*, 1997), καθώς επίσης και για την μετάδοση του ιού μέσω των αφίδων (Atreya *et al.*, 1990). Η CP αποτελείται από τρεις περιοχές, από τις οποίες τα διαφοροποιημένα καρβοξυτελικό και αμινοτελικό άκρα βρίσκονται εκτεθειμένα στην επιφάνεια του ιϊκού σωματιδίου, ενώ η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε RNAs. Το υψηλά συντηρημένο μοτίβο "DAG" στο αμινοτελικό άκρο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι ουσιώδες για την ικανότητα μετάδοσης του ιού μέσω των αφίδων (Atreya *et al.*, 1990). Το περιεχόμενο του προαναφερθέντος μοτίβου είναι ικανό να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της, μέσω των αφίδων, μετάδοσης (Lopez-Moya *et al.*, 1999). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, πως τα αμινοξέα στις θέσεις 9, 10 και 11 αμέσως πριν του μοτίβου "DAG", υπόκεινται στο φαινόμενο της φυσικής επιλογής (Moury and Simon, 2011). Ως εκ τούτου, διαφοροποιήσεις στις συγκεκριμένες θέσεις μπορούν να μεταβάλλουν την αποτελεσματικότητα της μετάδοσης του ιού, όπως αποδείχτηκε για τη θέση 9 της πρωτεΐνης CP του ιού TEV (*Tobacco etch virus*) (Lopez-Moya *et al.*, 1999).

1.2.3 Αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος

Η αλληλουχία των αντιδράσεων, οι οποίες εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA συνίσταται στην τοποθέτηση των απαραίτητων πρωτεϊνών, ιικών και του ξενιστή, στις κυτταρικές μεμβράνες, τη συγκρότηση των συμπλόκων ιϊκής αντιγραφής (viral replication complexes, VRCs), τη σύνθεση της ιϊκής αλληλουχίας και τέλος την απελευθέρωση των αντιγράφων.

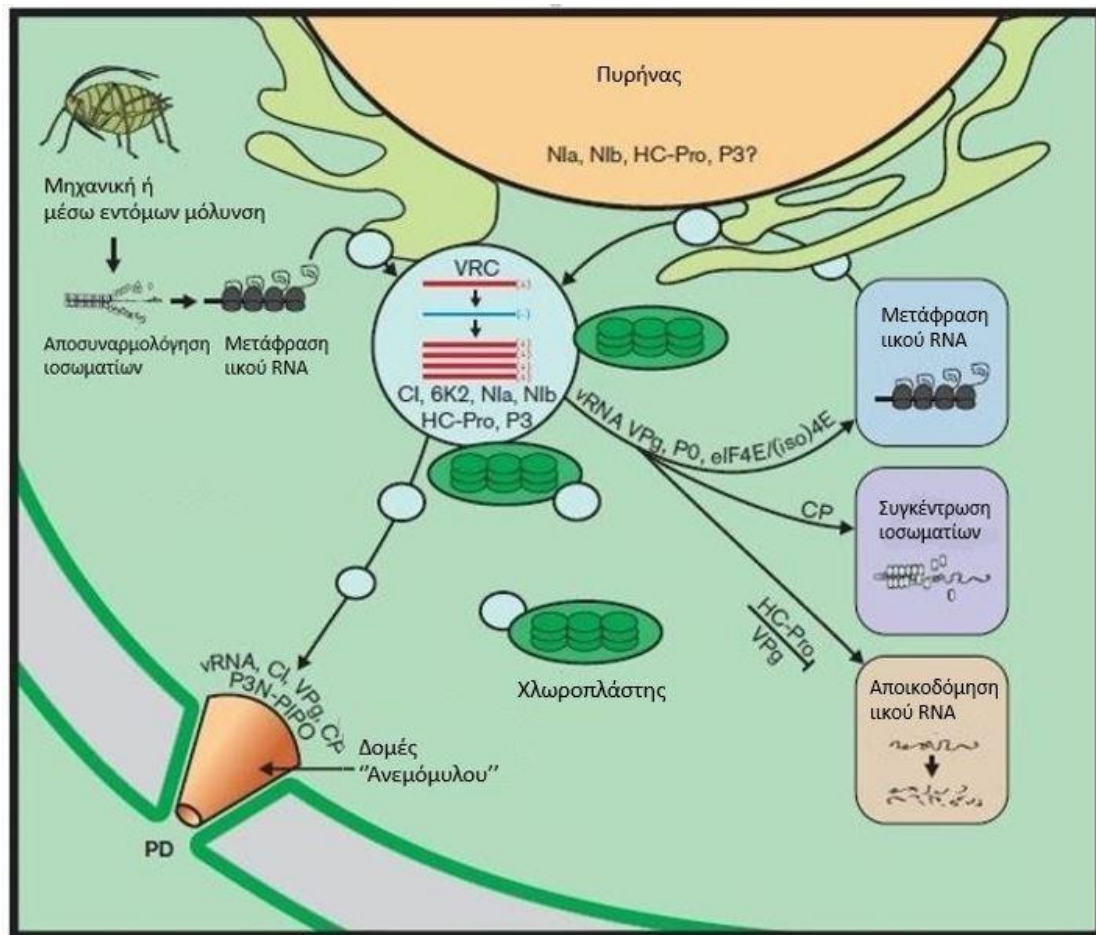
Ο σχηματισμός των VRCs αρχίζει με τη δημιουργία του πρόδρομου συμπλόκου 6K2-VPg-Pro (Schaad *et al.*, 1997). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη 6K2 προσδένει την NIa στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου. Η αλληλεπίδραση των NIa και NIb, με τη

σειρά της, προσδίδει δράση ιϊκής πολυμεράσης στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο αντιγραφής (Li *et al.*, 1997). Η δευτεροταγή δομή της 3' μη-μεταφραστικής περιοχής (untranslated region, UTR), σε συνδυασμό με την 3' περιοχή του τμήματος που μεταφράζει την πρωτεΐνη CP και με τους παράγοντες PABPs (polyA binding proteins), είναι αυτά που κατευθύνουν στο 3' άκρο του ιϊκού γονιδιώματος την πρωτεΐνη NIb, ώστε να ξεκινήσει η σύνθεση της μη κωδικής αλληλουχίας (Wang *et al.*, 2000). Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο CI-6K2 ίσως είναι εν μέρει υπεύθυνο για τη στρατολόγηση τμημάτων των συμπλόκων αντιγραφής στις μεμβράνες (Merits *et al.*, 2002), γεγονός που υποστηρίζεται από την εκτενέστερη ύπαρξη του στα μολυσμένα κύτταρα, σε σχέση με το σύμπλοκο CI-6K2-NIa (Merits *et al.*, 2002). Η πρωτεΐνη P3 σχηματίζει έγκλειστα, τα οποία προέρχονται από τις περιοχές εξόδου του ενδοπλασματικού δικτύου και διακινούνται από το σύμπλεγμα Golgi, όπως και τα κυστίδια της 6K2 (Cui *et al.*, 2010). Το γεγονός ότι, αυτές οι P3 συσχετιζόμενες δομές, τοποθετούνται χωρικά μαζί με τα 6K2 κυστίδια, και από το ότι η P3 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες CI, NIa και NIb (Merits *et al.*, 1999), υποδηλώνει τον ρόλο της P3 στον σχηματισμό των VRCs. Η ιϊκή πρωτεΐνη CI είναι μία ATP-εξαρτώμενη ελικάση της οποίας η λειτουργία είναι να ξετυλίγει συμπληρωματικούς RNA κλώνους κατεύθυνσης 3'-5'. Τέλος, ενώ η κύρια λειτουργία της HC-Pro είναι η καταστολή της RNA σίγησης, η ύπαρξη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα VRCs (Ala-Poikela *et al.*, 2011), υποδηλώνει τη συμμετοχή της στην αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος, με τρόπο που παραμένει ακόμα άγνωστος (Εικόνα 1.3).

1.2.4 Μετάφραση του ιϊκού γονιδιώματος

Στα μολυσμένα κύτταρα, το ιϊκό RNA πρέπει να είναι ικανό να ανταγωνιστεί τα ενδογενή mRNAs του ξενιστή, σε ότι αφορά τον μηχανισμό της μετάφρασης και τους διάφορους μεταφραστικούς παράγοντες. Σε αντίθεση με τα κυτταρικά RNAs, το ιϊκό γονιδίωμα δεν έχει καλύπτρα και είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο, όπως προαναφέρθηκε, με την πρωτεΐνη VPg. Η παρουσία μίας τέτοιας μη συνηθισμένης δομής στο 5' άκρο του ιϊκού RNA, υποδεικνύει τη συμμετοχή της πρωτεΐνης VPg στην έναρξη της μεταφραστικής διαδικασίας. Παρόλα αυτά, οι 5' αμετάφραστες

περιοχές πολλών ιών του γένους *Potyvirus*, διευκολύνουν την έναρξη της μετάφρασης, μέσω της σύνδεσης του ιϊκού γονιδιώματος στις ριβοσωμικές περιοχές πρόσδεσης (internal ribosome entry sites, IRES) (Basso *et al.*, 1994). Για αυτόν τον λόγο, η VPg πρωτεΐνες δεν απαιτούνται για την έναρξη της μετάφρασης, αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του γονιδιώματος. Με άλλα λόγια, επειδή η έναρξη της μετάφρασης μέσω των IRES, δεν βασίζεται στην αναγνώριση κανονικού μοτίβου καλύπτρας ή σε άλλους διερευνητικούς μηχανισμούς, δεν χρειάζεται και τη συμμετοχή όλων των παραγόντων έναρξης της μετάφρασης. Το γεγονός αυτό δίνει ένα πλεονέκτημα στους ιούς, οι οποίοι μπορούν και μεταφράζουν το γονιδίωμα τους στα κύτταρα-ξενιστές, ακόμη και υπό την πλήρη απουσία των τελευταίων. Η εξαρτώμενη λειτουργία των IRES στις 5' αμετάφραστες περιοχές των ιών *Potyvirus*, σε σχέση με τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης, μελετήθηκε χρησιμοποιώντας *in vitro* διαφορετικά πρωτόκολλα μετάφρασης αφαιρώντας μερικώς τους ευκαρυωτικούς παράγοντες έναρξης eIF4E, eIF(iso)4E, eIF4G, eIF(iso)4G, eIF4A και eIF4B (Gallie, 2001). Υπό αυτές τις ανταγωνιστικές συνθήκες, η 5' UTR ήταν σε θέση να ξεκινήσει τη μετάφραση, περισσότερο αποτελεσματικά συγκριτικά με μία αλληλουχία ελέγχου ίσου μεγέθους. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί υποθέτοντας ότι, είτε η 5' UTR χρησιμοποιεί τους eIFs με την μικρότερη συγκέντρωση, ή δεν τους χρειάζεται για την έναρξη της μετάφρασης. Επιπροσθέτως, οι ιϊκές πρωτεΐνες VPg αλληλεπιδρούν με τον eIF4E ή τον eIF(iso)4E, γεγονός που εξαρτάται από τα είδη του ιού και του ξενιστή (Wittmann *et al.*, 1997). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ουσιώδεις για μία επιτυχημένη ιϊκή μόλυνση, ενώ η διακοπή τους οδηγεί στην ανάπτυξη ιϊκής ανθεκτικότητας (Robaglia and Caranta, 2006). Τέλος πρέπει να αναφερθεί, ότι ο σημαντικός ρόλος της VPg δεν σχετίζεται μόνο στο γεγονός των αλληλεπιδράσεων της με τους eIFs, αλλά και στην ικανότητά της να ενισχύει τη μετάφραση ενός πλήρους ιϊκού RNA *in planta*, γεγονός το οποίο αποδείχτηκε στη μελέτη των Eskelin *et al.* (2011), όταν δεν ενισχύθηκε η μετάφραση ενός μονοσιστρωνικού mRNA μετά τη σύνδεση του με τη 5' UTR των ιών *Potyvirus* (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Σχηματική παρουσίαση των κύριων γεγονότων του μολυσματικού κύκλου των ιών *Potyvirus*. Νηματοειδή ιοσωμάτια εισέρχονται στο κύτταρο-ξενιστή με μηχανική μόλυνση ή μέσω αφίδας-φορέα. Στη συνέχεια γίνεται η μετάφραση του ιικού γονιδιώματος, από τα ριβοσώματα του ξενιστή, σε ένα πολυπρωτεϊνικό μόριο, το οποίο κατεργάζεται μεταγενέστερα από τρεις ιϊκές πρωτεάσες. Τουλάχιστον έξι ιϊκές πρωτεΐνες συμμετέχουν στην αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Τα VRCs του ιού σχηματίζονται στα σημεία εξόδου του ενδοπλασματικού δικτύου όπου εκμεταλλεύονται τα στοιχεία του εκκριτικού μονοπατιού του για να μεταφερθούν στο κυτταρικό τοίχωμα και συγκεκριμένα στις πλασμοδέσμες. Σε μεταγενέστερα στάδια της μόλυνσης, κυστίδια συγχωνεύονται με τις μεμβράνες των χλωροπλάστων, σχηματίζοντας περιπυρινικές σφαιρικές δομές. Το ιϊκό RNA που καταφτάνει από τα VRCs μπορεί είτε να μεταφραστεί περαιτέρω εκεί και να ενσωματωθεί σε νεοσύστατα VRCs συνεχίζοντας τον ιϊκό πολλαπλασιασμό ή να σχηματίσει ιοσωμάτια που προορίζονται για αποδόμηση (Ivanov et al., 2014).

1.3 Οι πρωτεΐνες P3 και P3N-PIPO

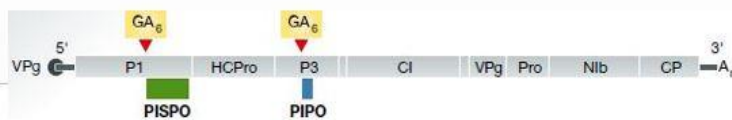
Η P3 πρωτεΐνη των μελών του γένους *Potyvirus* είναι από τις λιγότερο μελετημένες πρωτεΐνες λόγω της έλλειψης λειτουργικών ή δομικών μοτίβων στην αλληλουχία της. Ο λειτουργικός της ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ενώ όπως προαναφέρθηκε έχει προταθεί ως πρωτεΐνη που βοηθά στην αντιγραφή του ιού, στη μετακίνησή του στο φυτό καθώς και στην μολυσματικότητά του. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της ποικίλει από τον πυρηνίσκο και τον πυρήνα έως το κυτταρόπλασμα και τις πλασμοδέσμες. Ορισμένες P3 πρωτεΐνες ιών του γένους αλληλεπιδρούν, ισχυρά ή λιγότερο ισχυρά με άλλες ιϊκές, όπως η NIa, HC-Pro, P1 και NIb, αλλά ο λειτουργικός ρόλος της αλληλεπίδρασης αυτής δεν έχει αποσαφηνιστεί. Πρόσφατα,δείχθηκε η αλληλεπίδραση της P3 πρωτεΐνης του ιού *Soybean mosaic virus* (SMV) με τον ευκαρυωτικό παράγοντα eEF1A (eukaryotic Elongation Factor 1 alpha) (Luan et al, 2016). Η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη eEF1A συνδέεται με ακετυλιωμένα tRNAs τα οποία μεταφέρει στα ριβοσώματα συμμετέχοντας έτσι στην επιμήκυνση των πολυπεπτιδίων κατά τη μετάφραση. Επιπρόσθετα, φαίνεται να συμμετέχει στο μηχανισμό UPR (unfolded protein response, UPR) που σχετίζεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Ο μηχανισμός αυτός, γνωστός και ως ER καταπόνηση, δρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ενεργοποιείται από τις μη αναδιπλωμένες ή λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες που παράγονται κατά την ύπαρξη αβιοτικών ή βιοτικών καταπονήσεων. Έτσι, η αλληλεπίδραση της P3 πρωτεΐνης του SMV με τον eEF1A υποδηλώνει την εμπλοκή της ER καταπόνησης ως απόκριση του φυτού στον πολλαπλασιασμό του ιού. Ταυτόχρονα εμπλέκεται στην ειδικότητά του ως προς τον ξενιστή, καθώς στις ανθεκτικές ποικιλίες σόγιας η αλληλεπίδραση αυτή δεν υφίσταται (Luan et al, 2016).

Όπως προαναφέρθηκε, ήταν κοινώς αποδεκτό πως, το (+) RNA γονιδίωμα των ιών του γένους *Potyvirus* περιείχε ένα μοναδικό ORF, το οποίο κωδικοποιούσε ένα μόριο πολυπρωτεϊνικής μορφής, το οποίο, μετά από μία διαδικασία πέψης του, διασπόταν σε 10 ιϊκές πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου, προκάλεσε μεγάλο ενδιαφέρον όταν αναγνωρίστηκε ένα λειτουργικό επικαλυπτόμενο ORF, το PIPO (Pretty Interesting Potyvirus ORF). Το PIPO ανακαλύφθηκε μέσω μίας σειράς γονιδιωματικών αναλύσεων ιών του γένους *Potyvirus*, διαδικασία η οποία αποκάλυψε τόσο την συντήρηση του συγκεκριμένου ORF, όσο και ένα μοτίβο συνώνυμων και μη αλλαγών

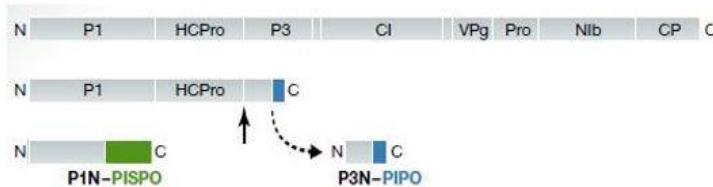
(Chung *et al.*, 2008), οι οποίες βρίσκονται σε αναλογία με την εξέλιξη της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη. Το όνομα της πρωτεΐνης P3N-PIPO προέκυψε, από το γεγονός ότι το PIPO κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, της οποίας το καρβοξυτελικό της άκρο είναι συζευγμένο με το αμινοτελικό άκρο της P3 (**Εικόνα 1.4.B**) (Olsper *et al.*, 2015). Επίσης ένα συντηρημένο GAAAAAA (GA₆) μοτίβο βρέθηκε στη αρχή του PIPO, το οποίο θεωρήθηκε πως είναι αυτό που τροποποιεί το πλαίσιο ανάγνωσης που απαιτείται για την έκφραση της P3N-PIPO, με την προσθήκη ενός μορίου αδενίνης, εξαιτίας ολίσθησης της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, κατά την αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος (**Εικόνα 1.4.Γ**) (Chung *et al.*, 2008).

Οι λειτουργίες της P3N-PIPO έχουν διερευνηθεί εκτενώς από την ανακάλυψή της και έπειτα. Χωρικά εντοπίζεται στις πλασμοδέσμες του φυτού-ξενιστή, όπου και δρα σε συνδυασμό με την CI, και συμμετέχει στην μεταξύ κυττάρων μετακίνηση του ιού (Wei *et al.*, 2010). Αυτός ο ρόλος της P3N-PIPO στην μετακίνηση του ιού ενισχύεται από την ικανότητα της να αλληλεπιδρά με την φυτική πρωτεΐνη PCaP1, η οποία είναι μία πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων του φυτού ξενιστή (Vijayapalani *et al.*, 2012). Η P3N-PIPO έχει εντοπιστεί σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0,8 – 2%) εντός του φυτού. Παρά το γεγονός ότι ο βασικός της ρόλος έχει προσδιοριστεί (Revers and Garcia, 2015), ο τρόπος της έκφρασής παραμένει ασαφής.

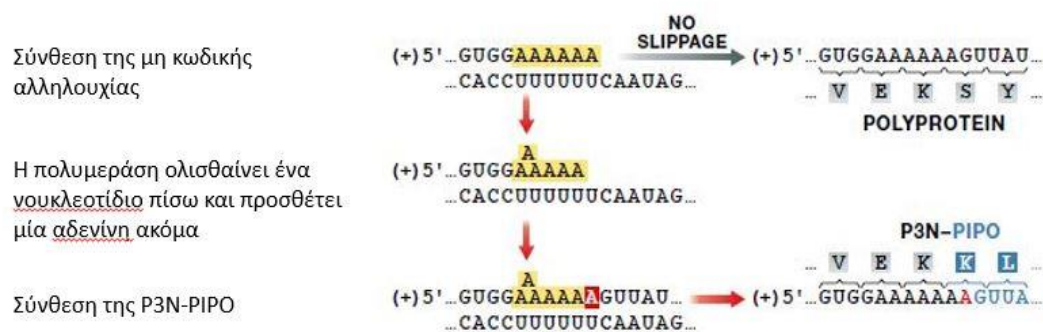
A. Οργάνωση του RNA γονιδιώματος των ιών του γένους *Potyvirus*



B. Προϊόντα μετάφρασης των ιών του γένους *Potyvirus*



Γ. Ολίσθηση της RNA πολυμεράσης



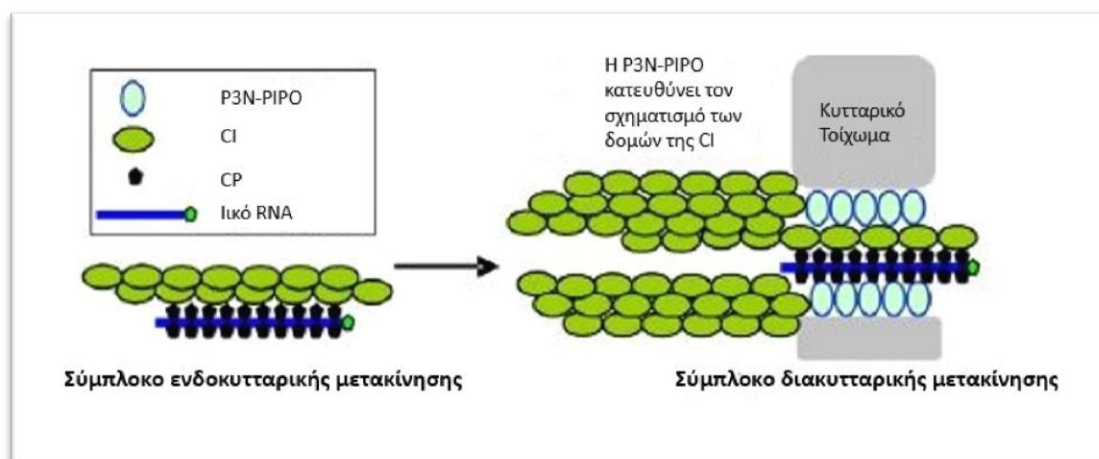
Εικόνα 1.4 (Α) Οργάνωση του (+)ssRNA γονιδιώματος των ιών του γένους *Potyvirus*. Παρουσιάζονται οι θέσεις εναλλακτικών ORFs, καθώς και οι θέσεις των μοτίβων GA₆. (Β) Προϊόντα μετάφρασης: άγριου τύπου (wt) πλήρους μεγέθους πολυπρωτεϊνικό μόριο, πολυπρωτεϊνικό μόριο που εκφράζεται από τροποποιημένο γονιδίωμα έπειτα από ολίσθηση πολυμεράσης και από το οποίο αποκόπτεται η πρωτεΐνη P3N-PIPO, έκφραση της P1N-PISPO. (Γ) Σύνθεση της μη κωδικής αλληλουχίας και προσθήκη ενός μορίου αδενίνης μέσω του φαινομένου ολίσθησης της πολυμεράσης (White, 2015).

1.4 Διακυτταρική μετακίνηση των ιών του γένους *Potyvirus*

Προκειμένου να επιτευχθεί μία διασυστηματική μόλυνση, οι φυτικοί ιοί πρέπει να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα και να μολύνουν τα γειτονικά υγιή φυτικά κύτταρα (Maule, 2008). Η μεταξύ των κυττάρων ιϊκή μετακίνηση επιτυγχάνεται μέσω των πλασμοδεσμών, που μπορούν και διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα, εγκαθιστώντας με αυτόν τον τρόπο μία μορφή κυτοπλασματικής και ενδομεμβρανικής συνέχειας. Οι πλασμοδέσμες επιτρέπουν σε μόρια μικρού μεγέθους να μεταφέρονται μεταξύ γειτονικών κυττάρων και ρυθμίζουν τη διακυτταρική μετακίνηση μεγάλου μεγέθους μορίων ή μοριακών συμπλόκων, όπως τα ιοσωμάτια ή τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά (RNPs) σύμπλοκα. Η ιϊκή διακυτταρική μετακίνηση είναι αποτέλεσμα συνεργασίας των ιϊκών πρωτεϊνών μετακίνησης (movement proteins, MPs) και των παραγόντων του κυττάρου-ξενιστή (Heinlein, 2015) και μπορεί να διαχωριστεί σε 4 βασικές κατηγορίες, αναλόγως με τα χαρακτηριστικά της συμβολής της CP και των MPs. Στην πρώτη κατηγορία μόλυνσης εμπεριέχεται το σύμπλοκο ιϊκού RNA/MP, δηλαδή του προαναφερθέντος RNP. Οι ιοί του γένους *Tobamovirus*, *Bromovirus* and *Cucumovirus* ανήκουν σε αυτήν τη κατηγορία. Συγκεκριμένα στον TMV μία συγκεκριμένη MP στοχεύει και αυξάνει το όριο αποκλεισμού των πλασμοδεσμών για τη μετακίνηση των RNPs, ανεξάρτητα της CP. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι ραβδόμορφοι ιοί, δηλαδή τα γένη *Hordeiviruses*, *Pomoviruses*, *Pecluviruses*, *Benyviruses* και *Potexviruses*. Αυτοί οι μεταφράζουν μία ομάδα τριών γονιδίων (three gene block, TGB), οι πρωτεΐνες των οποίων συντονίζουν τη διακυτταρική μετακίνηση των ιϊκών RNPs (ή των ιϊκών ιοσωματίων στη περίπτωση του γένους *Potexvirus*). Η CP απαιτείται για τη μετακίνηση στη συγκεκριμένη κατηγορία. Η τρίτη κατηγορία αποτελείται από τα γένη *Comovirus* και *Nepovirus*, των οποίων οι MPs, χρησιμοποιώντας τους μικροσωληνίσκους του ξενιστή, κατευθύνουν τα ιοσωμάτια στις πλασμοδέσμες, όπου τα ιοσωμάτια με τη σειρά τους διαπερνούν και τροποποιούν της τελευταίες.

Η τέταρτη κατηγορία αποτελείται από τους ιούς του γένους *Potyvirus*, για τη μετακίνηση των οποίων απαιτούνται δομές σχήματος “ανεμόμυλου” και όχι σωληνοειδείς στις πλασμοδέσμες για την μετακίνηση του ιοσωματίου (Wei et al., 2010). Για να αρχίσει η μετακίνηση των ιών του γένους στα γειτονικά υγιή κύτταρα,

τα ιοσωμάτια συγκεντρώνονται από τις CI πρωτεΐνες ή από δομές σχηματισμένες μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών CI-CI στα VRCs, τα οποία βρίσκονται γειτονικά των πρωτοπλαστών. Στη συνέχεια, τα σύμπλοκα CI-ιοσωματίων συνδέονται με την πρωτεΐνη P3N-PIPO, η οποία είτε είναι ήδη συνδεδεμένη στις πλασμοδέσμες ή κατευθύνονται μαζί στις τελευταίες. Εκεί, οι δομές CI αναπτύσσονται πάνω στις P3N-PIPO, σχηματίζοντας μία νηματώδη σχήματος δομή, η οποία θα συγκεντρώσει περαιτέρω ιοσωμάτια για τη μετακίνησή τους. Η πραγματική κίνηση των ιοσωματίων διαμέσου των πλασμοδέσμων, μπορεί να επιτυγχάνεται μέσω συμπλόκων της CI, τα οποία έχουν ήδη διασχίσει τις πλασμοδέσμες, παρόλο που η διαδικασία αυτή παραμένει άγνωστη. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί, ότι διακόπτοντας το εκκριτικό μονοπάτι του ενδοπλασματικού δικτύου-Golgi, εμποδίζεται και η μεταφορά των P3N-PIPO και CI στις πλασμοδέσμες, γεγονός που υποδηλώνει πως το σύστημα ακτίνης-μυοσίνης δεν επηρεάζει τη συγκεκριμένη στόχευση των πρωτεϊνών. Η συμμετοχή της CP στη διακυτταρική μετακίνηση του ιού οφείλεται στο γεγονός, ότι το καψιδιομένο ιϊκό RNA αποτελεί τη μολυσματική μονάδα του ιού. Τέλος, από τα γεγονότα που παρουσιάζονται παραπάνω, η παροδική σύνδεση της CI με τις πλασμοδέσμες και κατά επέκταση η διακυτταρική μετακίνηση των ιών *Potyvirus* μεταβάλλεται αναλογικά με τη μετάφραση του ιϊκού γονιδιώματος, την τροποποίηση του πλαισίου ανάγνωσης και των επιπέδων σχηματισμού του συμπλόκου CI-P3N-PIPO (Taiyun et al., 2010) (Εικόνες 1.3, 1.5).



Εικόνα 1.5 Μοντέλο διακυτταρικής μετακίνησης των ιών *Potyvirus*. Το σύμπλοκο CI-ισωμάτιων μεταφέρεται ενδοκυτταρικά στις τροποποιημένες πλασμοδέσμες, όπου βρίσκονται οι σχηματισμοί της CI, οι οποίοι συνδέονται στις ήδη συνδεδεμένες με τις πλασμοδέσμες P3N-PIPO. Έπειτα το ισωμάτιο μεταφέρεται διαμέσου των δομών της CI και των πλασμοδέσμων στα γειτονικά κύτταρα(*Taiyun et al.*, 2010).

1.5 Αλληλεπιδράσεις της P3N-PIPO με φυτικές πρωτεΐνες

Οι ιϊκές MPs αλληλεπιδρούν με παράγοντες του φυτού ξενιστή προκειμένου να επιτευχθεί η μετακίνηση του ιού διασυστηματικά. Μέχρι σήμερα έχουνδειχθεί δύο αλληλεπιδράσεις μεταξύ της P3N-PIPO και φυτικών πρωτεϊνών. Η πρώτη αφορά την PCaP1 πρωτεΐνη του *Arabidopsis thaliana* και την P3N-PIPO του *Turnip mosaic virus* (TuMV) (*Vijayapalani et al.*, 2012). Επιπρόσθετα, η σύνδεση της P3N-PIPO του TuMV στην PCaP1 φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη διακυτταρική μετακίνηση του ιού. Η PCaP1 είναι μία υδρόφιλη με λειτουργία δέσμευσης κατιόντων πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στην πλασματική μεμβράνη μέσω N-μυριστοϋλίωσης (*Nagasaki et al.*, 2008). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται συστηματικά στα περισσότερα οργάνδια του φυτού, ενώ η έκφραση της αυξάνεται με τη παρουσία διεγερτών, όπως για παράδειγμα της φλαγκελίνης (*Ide et al.*, 2007). Η φυσιολογική λειτουργία της PCaP1 σχετίζεται με τη ρύθμιση του

κυτταροσκελετού και το ορθό άνοιγμα και κλείσιμο των στοματικών συμπλόκων μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από το ασβέστιο (Li et al., 2011, Nagata et al., 2016).

Φυτά ολικής απώλειας λειτουργίας του γονιδίου εμφανίζουν μείωση της εξάπλωσης του TuMV με αποτέλεσμα τον εντοπισμό του στα σημεία της μόλυνσης και την εμφάνιση λιγότερων συμπτωμάτων (Vijayapalani et al., 2012). Η ίδια αλληλεπίδραση δείχθηκε και στο φυτό *Nicotiana benthamiana*. Η ορθόλογη πρωτεΐνη της PCaP1 στον καπνό, NbDREPP, είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με τις CI και P3N-PIPO του *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV). Η σύνδεση αυτή βοηθά στη μεταφορά του ιού στα γειτονικά κύτταρα μέσω του εκκριτικού μηχανισμού και του συστήματος της ακτινομυοσίνης (Geng et al., 2015).

Όπως προαναφέρθηκε οι κύριες πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη διακυτταρική μετακίνηση των ιών *Potyvirus* είναι οι CP, CI και η P3N-PIPO. Εντούτοις καμία από τις τελευταίες δεν παρουσιάζει ικανότητα μεμβρανικής σύνδεσης, παρόλο που η διακυτταρική μετακίνηση απαιτεί μία τέτοια λειτουργία (Niehl et al., 2011). Συμπερασματικά λοιπόν, μία αλληλεπίδραση της PCaP1 με την P3N-PIPO θα αποτελούσε τον εκλειπόμενο κρίκο για τη σύνδεση του συμπλόκου κίνησης του ιού στην πλασματική μεμβράνη, από όπου θα μπορούσε να κατευθυνθεί περαιτέρω στις πλασμοδέσμες (Vijayapalani et al., 2012). Μία άλλη υπόθεση όσο αναφορά την αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών, προκύπτει από την αύξηση των επιπέδων μορίων ασβεστίου στις περιοχές των πλασμοδεσμών, γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα της PCaP1 να προσδένει μόρια ασβεστίου και καλμοδουλίνης (Ca^{2+} -CAM), το οποίο επιφέρει αύξηση των ορίων αποκλεισμού των πλασμοδεσμών, μειώνοντας τη συγκέντρωση της καλλόζης. Η καλλόζη συσσωρεύεται στις περιοχές εισόδου των πλασμοδεσμών ως απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες ή σε ιϊκές μολύνσεις, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τα όρια αποκλεισμού των πλασμοδεσμών (Ueki et al., 2010). Η τοπική συγκέντρωση της καλλόζης αυξάνεται υπό την παρουσία ασβεστίου (Furch et al., 2010), το οποίο με τη σειρά του αυξάνεται ως αποτέλεσμα μιας επιτυχημένης άμυνας εναντίον ιϊκών μολύνσεων (Otulak et al., 2011). Επιπλέον, η δημιουργία πρωτοπλαστών με μεταλλαγή knock-out στο γονίδιο *PCaP1*, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ιϊκού RNA καθώς το τελευταίο δεν μεταφερόταν στην πλασματική μεμβράνη, αλλά παρέμενε στα VRCs, γεγονός που οδηγούσε σε περαιτέρω κύκλους αντιγραφής (Vijayapalani et al., 2012).

Διαφορετική είναι η αλληλεπίδραση της PCaP1 του της *Nicotiana benthamiana*, ύστερα από μόλυνση με τον *Bamboo mosaic virus* (BaMV) του γένους *Potexvirus*. Σύμφωνα λοιπόν με την έρευνα των Huang et al. (2017), η PCaP1 αλληλεπιδρά με την RdRp που περιέχεται στο σύμπλοκο μετακίνησης του BaMV, παγιδεύοντας το τελευταίο σε μία περιορισμένη μετακίνηση μεταξύ κυττάρων.

Επιπλέον, η πρωτεΐνη DREPP της *N. benthamiana* παρουσιάζει ομοιότητα 52% στην αμινοξική της αλληλουχία με την PCaP1, και μοιράζεται ένα συντηρημένο αμινοτελικό άκρο, υποδηλώνοντας πως η πρωτεΐνη DREPP είναι ομόλογη της PCaP1 (Logan et al., 1997). Επίσης, η DREPP παρουσιάζει λειτουργία ID (inhibitor DNA-binding) πρωτεϊνών, το οποίο σημαίνει πως υφίσταται μία σειρά αναδιπλώσεων, προκειμένου να αλληλεπιδράσει με άλλα πρωτεϊνικά μόρια (Marin and Ott, 2014). Όπως αναφέρθηκε το γεγονός της παρουσίας των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα οργανίδια του κυττάρου, επηρεάζεται συν τοις άλλοις και από την έκφραση των πρωτεϊνών, με τις οποίες μπορούν και αλληλοεπιδρούν. Με αυτόν τον τρόπο αποδείχτηκε και η συμμετοχή της DREPP στην διακυτταρική μετακίνηση του *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV) όπου, η ταυτόχρονη έκφραση των πρωτεϊνών DREPP και CInlplanta, είχε ως αποτέλεσμα την κοινή παρουσία τους στην περιφέρεια του φυτικού κυττάρου, ενώ όταν εκφράστηκε και η πρωτεΐνη P3N-PIPO, απαντήθηκαν και οι τρεις στις πλασμοδέσμες, όπου δημιουργείται το σύμπλοκο για τη διακυτταρική μετακίνηση. Τέλος πρέπει να αναφερθεί, πως η DREPP χρησιμοποιεί διαφορετικό τρόπο, σε σχέση με τις ιϊκές πρωτεΐνες, για να κατευθυνθεί στις πλασμοδέσμες, δηλαδή, ενώ οι ιϊκές MPs χρησιμοποιούν το εκκριτικό μονοπάτι του ενδοπλασματικού δικτύου, η κίνηση της DREPP εξαρτάται από το σύστημα ακτίνης-μυοσίνης (Chao et al., 2015).

Πρόσφατα δείχθηκε η αλληλεπίδραση της P3N-PIPO του *Soybean mosaic virus* (SMV) με την πρωτεΐνη SNARE12 της σόγιας. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στους SNARE υποδοχείς που συμμετέχουν στη μεταφορά κυστιδίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο Golgi (Sanderfoot et al., 2000). Ωστόσο ο λειτουργικός ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ της SNARE12 και της P3N-PIPO του ιού παραμένει άγνωστος, ενώ εικάζεται ότι συμμετέχει στη στόχευση της P3N-PIPO πρωτεΐνης στις πλασμοδέσμες (Song et al., 2016).

1.6 Γενετική ανθεκτικότητα στους ιούς του γένους *Potyvirus*

Μέχρι σήμερα, η καλλιέργεια ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα σε ιολογικές προσβολές, αποτελεί έναν από τους κύριους τρόπους διαχείρισης των ιολογικών ασθενειών των φυτών. Στα φυσικά οικοσυστήματα η γενετική ποικιλομορφία των φυτών, που συνεπάγεται και την ποικιλομορφία των γενετικών τόπων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της εξάπλωσης επιδημιών (*Ostfeld and Keesing, 2012*). Οι κύριοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που διαθέτουν τα φυτά έναντι των ιών είναι: α) η RNA σίγηση (RNA silencing) που αποτελεί ένα ζωτικό στοιχείο της εγγενούς αντικής αντίδρασης των φυτών, και στοχεύει «εισβάλλοντα νουκλεϊκά οξέα, β) την κυρίαρχη ανθεκτικότητα (dominant resistance) κατά την οποία η άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση μεταξύ παράγοντα άμυνας των φυτών και του τελεστή (effector) που κωδικοποιείται από το γονίδιο μολυσματικότητας του ιού πυροδοτεί αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive reaction, HR) ή ακραία ανθεκτικότητα (extreme resistance, ER) και γ) η υπολειπόμενη ανθεκτικότητα (recessive resistance).

Ο τύπος της υπολειπόμενης ανθεκτικότητας των φυτών στους ιούς αφορά στη μοριακή αλληλεπίδραση, ή μη, μεταξύ ενός παράγοντα μολυσματικότητας του ιού και ενός παράγοντα ανθεκτικότητας του φυτού ξενιστή. Η έλλειψη αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων παρεμποδίζει τη συμπλήρωση του κύκλου πολλαπλασιασμού και εξάπλωσης του ιού και καθορίζει εάν ένας ξενιστής είναι ανθεκτικός ή μη στον συγκεκριμένο ιό (*Fabre et al., 2015*). Από τα περίπου 200 ήδη γνωστά γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών σε ιϊκές ασθένειες, τα μισά αφορούν υπολειπόμενα κληρονομούμενα γονίδια (*Díaz-Pendón et al., 2004, Kang et al., 2005*). Επομένως, η ανίχνευση τέτοιων γενετικών τόπων και η κατανόηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν με συγκεκριμένες ιϊκές πρωτεΐνες, αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την αποκάλυψη νέων γονιδίων ανθεκτικότητας και την αξιοποίησή τους στη δημιουργία νέων ανθεκτικών ποικιλιών. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της οικογένειας των γονιδίων που κωδικοποιούν ευκαριωτικούς παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eukaryotic translation initiation factors, eIF) και της αλληλεπίδρασής τους με ιούς του γένους *Potyvirus*.

Το πρώτο γονίδιο που χαρακτηρίστηκε και προσδίδει υπολειπόμενη ανθεκτικότητα έναντι του PVY αφορά το *pvr2* της πιπεριάς (*Capsicum* sp.) (Ruffel et al., 2002). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για έναν eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) παράγοντα που σχετίζεται με την έναρξη της μετάφρασης των mRNA μεταγράφων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα, ο eIF4E προσδένεται στην 5'-cap δομή εξυπηρετώντας στη στρατολόγηση των φυτικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην μετάφραση των mRNAs (Robaglia and Caranta, 2006). Όπως προαναφέρθηκε, το γένος *Potyvirus* δεν εμφανίζει τέτοιες cap δομές αλλά μία ιϊκή πρωτεΐνη, την VPg, η οποία προσδένεται στο 5' άκρο του γονιδιωματικού τους RNA. Η VPg φαίνεται να αλληλεπιδρά με μία ή περισσότερες ισομορφές των eIF4E παραγόντων γεγονός που υποδηλώνει τη χρήση της μεταφραστικής μηχανής του φυτού από τους Poty-ιούς για τον πολλαπλασιασμό τους. Πράγματι, φυτά που εμφανίζουν αμινοξικές αντικαταστάσεις στην αλληλουχία των eIF4E ή eIFiso4E παραγόντων, σε θέσεις που σχετίζονται με την περιοχή δέσμευσης της VPg, εμφανίζουν ανθεκτικότητα στους ιούς του γένους *Potyvirus* (Duprat et al., 2002; Lellis et al., 2002; Ruffel et al., 2002). Με τη σειρά τους οι ιοί μπορούν να προσαρμοστούν μέσω αλλαγών της αμινοξικής αλληλουχίας της VPg αποκαθιστώντας με αυτόν τον τρόπο την αλληλεπίδραση της με τις μεταλλαγμένες eIF4E και eIFiso4E ισομορφές (Charron et al., 2008). Η VPg του PVY έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί έναν παράγοντα υπέρβασης της υπολειπόμενης ανθεκτικότητας (resistance-breaking, RB) σε φυτά πιπεριάς (Moury et al., 2004), στο συγγενές της τομάτας είδος *Solanum habrochaites* (Moury et al., 2004) και στον καπνό (Lacroix et al., 2011; Masuta et al., 1999).

Το μοτίβο διαφοροποίησης των eIF4E-VPg έχει προταθεί ως ένα εμβληματικό παράδειγμα του μοντέλου αντιστοιχίας των αλληλομόρφων (matching allele model) στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων. Κατά το μοντέλο αυτό κάθε γονότυπος του φυτοπαθογόνου είναι προσαρμοσμένος σε ένα ή σε περιορισμένο εύρος αλληλομόρφων ανθεκτικότητας στον πληθυσμό των ξενιστών, ενώ ταυτόχρονα η ικανότητα του για υπέρβαση ανθεκτικότητας δεν επιφέρει κάποιο κόστος στην αρμοστικότητά του (fitness). Συνοψίζοντας, (α) η υψηλή ποικιλομορφία και η θετική επιλογή που παρατηρείται σε ένα μικρό μόνο αριθμό αμινοξέων των VPg και eIF4E, (β) το γεγονός ότι οι αλλαγές αυτές συνδέονται άμεσα είτε με την εμφάνιση ανθεκτικότητας του ξενιστή είτε με τη μολυσματικότητα του παθογόνου και (γ) η σχετικά πρόσφατη εμφάνιση των Poty-ιών, καταδεικνύουν μια σπάνια περίπτωση

πρόσφατης και ταχείας συνεξέλιξης στις αλληλεπιδράσεις φυτών και φυτοπαθογόνων (Moury *et al.*, 2014).

1.7 Επαγωγή σίγησης γονιδίων μέσω του ιϊκού φορέα του ιού του κροταλίσματος του καπνού (*Tobacco rattle virus*, TRV)

Η RNA σίγηση είναι ένας μηχανισμός αποδόμησης του RNA εξειδικευμένος ως προς την ακολουθία νουκλεοτιδίων, που πρώτα ανακαλύφθηκε σε διαγονιδιακά φυτά (Naroli *et al.*, 1990). Ο ίδιος μηχανισμός ισχύει σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου και έχει ρόλο ρύθμισης της έκφρασης καθώς και ρόλο αντι-ιϊκό ή γενικότερα προστασίας από ξένα ως προς τον οργανισμό νουκλεϊνικά οξέα και μεταθετά στοιχεία.

Στα φυτά, η RNA σίγηση λειτουργεί ως ένα φυσικό αντι-ιϊκό σύστημα άμυνας που ενεργοποιείται ως αντίδραση στην ύπαρξη διπλής αλυσίδας RNA (dsRNA). Οι ιοί, καθώς και διαγονίδια που έχουν εισαχθεί ως αντίστροφες επαναλήψεις μπορούν απευθείας να παράγουν dsRNA, ενώ υψηλά μεταγραφόμενα μονής εισδοχής διαγονίδια παράγουν μη φυσιολογικά μεταγραφήματα που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την παραγωγή dsRNA. Στη συνέχεια, το dsRNA γίνεται στόχος για μια εξειδικευμένη dsRNA ριβονουκλεάση η οποία παράγει μικρά εμπλεκόμενα RNAs (small interfering, siRNAs) τα οποία λειτουργούν ως οδηγοί για την εξειδικευμένη αποδόμηση ομόλογων RNAs από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο νουκλεάσης (Ding *et al.*, 2004).

Χαρακτηριστικό της RNA σίγησης είναι η δημιουργία διασυστηματικού σήματος και η ενεργοποίηση του μηχανισμού και σε ιστούς απομακρυσμένους από αυτούς που πρώτο-ενεργοποιήθηκε ο μηχανισμός.

Αν και η RNA σίγηση στα φυτά έχει μελετηθεί εκτενέστερα χρησιμοποιώντας διαγονίδια, οι ιοί μπορούν να είναι ταυτόχρονα επαγωγείς και στόχοι της RNA σίγησης (Ratcliff *et al.*, 1997, Voinnet *et al.*, 1999). Οι μηχανισμοί της RNA σίγησης τόσο όταν ενεργοποιούνται από μόλυνση ιού (Virus Induced Gene Silencing, VIGS) όσο και από διαγονίδια μοιράζονται πολλά συστατικά, αλλά επίσης χρησιμοποιούν

και διαφορετικές βιοχημικές οδούς για να δημιουργήσουν τη διπλή αλυσίδα του RNA που ενεργοποιεί τη διαδικασία (Dalmay et al., 2000, Béclin et al., 2002, Morel et al., 2002)

Η σίγηση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων μέσω επαγωγής της με ιικό φορέα (VIGS), χρησιμοποιείται ευρέως για της ανάγκες της αντίστροφης γενετικής στα φυτά. Η απλότητα, αμεσότητα και το χαμηλό κόστος εφαρμογής της συγκεκριμένης τεχνικής, την καθιστούν κατάλληλη ως εναλλακτική λύση για μία μετα-μεταγραφική σίγηση, με σκοπό τη μελέτη της λειτουργίας των γονιδιακών προϊόντων που μας ενδιαφέρουν. Χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη ενός φαινοτύπου, ο οποίος προέρχεται από την απώλεια της λειτουργίας ενός γονιδίου που συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, σε μεταβολικά μονοπάτια, σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροοργανισμών και φυτού και σε καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά, για τη μελέτη του φαινομένου της ανάρρωσης του φυτού ύστερα από ιική μόλυνση (van Kammen, 1997). Ο ιός *Tobacco rattle virus* (TRV) του γένους *Tobravirus*, παρουσιάζει έναν αριθμό πλεονεκτημάτων, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως φορέας γονιδιακής έκφρασης, καθώς προσβάλλει έναν μεγάλο αριθμό ξενιστών σε διαφορετικά γένη και πολλαπλασιάζεται σε υψηλούς τίτλους τόσο στο υπέργειο όσο και στο ριζικό σύστημα των φυτών. Το γονιδίωμά του αποτελείται από δύο μονόκλωνα (+) RNAs, RNA1 και RNA2 (Harrison and Robinson, 1986). Το RNA1, κωδικοποιεί όλες τις απαραίτητες πρωτεΐνες για την ιική αντιγραφή και μετακίνηση εντός του φυτού-ξενιστή, ενώ παρουσιάζει ικανότητα μόλυνσης απουσία του δεύτερου RNA. Το RNA2 ποικίλει σε μέγεθος ανάμεσα στις απομονώσεις του ιού, και κωδικοποιεί την CP και ενίοτε μία ή περισσότερες μη δομικές πρωτεΐνες, 2b και 2c, που εμπλέκονται στη μετάδοση του ιού με νηματώδεις φορείς. Στους τροποποιημένους ιούς τα τελευταία έχουν αντικατασταθεί από αλληλουχίες συμβατές για κλωνοποίηση με περιοριστικά ένζυμα ώστε να τοποθετηθούν στη θέση τους οι αλληλουχίες ενδιαφέροντος (MacFarlane and Popovich, 2000).

1.8 Εξέλιξη και προσαρμοστικότητα των φυτικών ιών

1.8.1 Στάδια εμφάνισης φυτικών ιών σε νέα φυτά-ξενιστές

Οι αιτίες, οι οποίες ευνοούν τη εμφάνιση φυτικών ιών σε νέα φυτά-ξενιστές, μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: α) αλλαγές στην οικολογία των φυτών-ξενιστών και/ή των ιών, β) αλλαγές στη γενετική σύνθεση στους πληθυσμούς του ξενιστή, γ) αλλαγές στη γενετική σύνθεση στους πληθυσμούς του ιού, δ) στη περίπτωση της μετάδοσης του ιού με φορέα, αλλαγές στην οικολογία και τη γενετική σύνθεση του τελευταίου (Jones, 2009). Οι νεοεμφανιζόμενοι ιοί προέρχονται από είδη ή πληθυσμούς ξενιστών, στους οποίους έχουν ήδη προσαρμοστεί. Η διάδοση του φυτικού ιού από τον προηγούμενο ξενιστή σε ένα καινούργιο περιβάλλον, όπου θα εγκαθιδρύσει νέες παραγωγικές μολύνσεις και επιτυχημένους μεταξύ των ξενιστών μηχανισμούς μετάδοσης, αποτελεί τα στάδια για μια καινούργια εμφάνιση του φυτικού ιού (Elena et al., 2011). Σε πρώτο στάδιο ο ιός πρέπει να μεταπηδήσει από έναν μολυσμένο πληθυσμό ξενιστών σε φυτά του ίδιου είδους-ξενιστή σε διαφορετικό οικολογικό περιβάλλον ή σε νέο είδος ξενιστή. Αυτή η μεταπήδηση σε άλλο ξενιστή, απαιτεί την επαφή μεταξύ των πληθυσμών των ξενιστών, το οποίο ευνοείται από αλλαγές της οικολογίας των ξενιστών, των ιικών φορέων και/ή των ιών. Σε δεύτερο στάδιο, ο ιός πρέπει να προσαρμοστεί στον νέο ξενιστή ή στο νέο περιβάλλον, με σκοπό η μόλυνση να είναι επιτυχημένη, και να μπορέσει να υποστηριχτεί η μετάδοση μεταξύ του είδους του νέου ξενιστή ή του νέου περιβάλλοντος. Σε αυτό το σημείο η νέα ιϊκή μόλυνση ανεξαρτητοποιείται από τον προηγούμενο ξενιστή. Τέλος και ως τελευταίο στάδιο, η επιδημιολογία του ιού πρέπει να αλλάξει, ώστε να βελτιστοποιηθεί η μεταξύ των νέων ξενιστών μετάδοση στους νέους πληθυσμούς, πράγμα που μπορεί να επιτευχθεί είτε με προσαρμογή σε έναν νέο ιϊκό φορέα ή με την εγκαθίδρυση ενός νέου μηχανισμού μετάδοσης (Elena et al., 2011).

1.8.2 Προσαρμογή και αλλαγή νέων φυτών-ξενιστών

Το εύρος των φυτών-ξενιστών ενός ιού καθορίζεται από έναν αριθμό παραγόντων, κάποιοι εκ των οποίων αφορούν την επιδημιολογία του, ενώ άλλοι εξαρτώνται από το γενετικό υπόβαθρο του εκάστοτε ιού. Υποστηρίζεται, πως το εύρος των ξενιστών των φορέων προκαθορίζει και το εύρος ξενιστών και των ιών, γεγονός από το οποίο συμπεραίνεται, ότι οι φυτικοί ιοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση σε φορείς παρά σε ξενιστές (*Power and Flecker, 2003*). Αυτή η υπόθεση τονίζει τη σημαντικότητα των φορέων στην οικολογία και την εκ νέου εμφάνιση των ιών, αλλά είναι μία απλούστευση της πραγματικότητας. Η βιολογική καταλληλότητα ενός οργανισμού εξαρτάται από το περιβάλλον στο οποίο διερευνάται. Για αυτόν το λόγο, επειδή ένας ξενιστής αποτελεί το θεμελιώδες περιβάλλον για ένα παράσιτο, η ιική καταλληλότητα και ικανότητα προσαρμογής ποικίλει στον εκάστοτε πιθανό ξενιστή. Η διαφορά της ικανότητας προσαρμογής ενός ιού μεταξύ δύο ξενιστών είναι καθοριστικής σημασίας για το εύρος των ξενιστών, καθώς και για τη μεταπήδηση σε νέο ξενιστή. Η εμφάνιση ιών με περιορισμένο εύρος ξενιστών σε καλλιεργήσιμα είδη, προερχόμενα από φυτά τα οποία ανήκουν είτε στο ίδιο γένος ή στην ίδια οικογένεια, υποδεικνύει ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της ταξινομικής εγγύτητας των φυτών-ξενιστών και της ικανότητας προσαρμογής των ιών σε αυτούς (*Moreno-Pérez et al., 2013*).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, δημιουργείται η υπόθεση της προσαρμοστικής εναλλαγής μεταξύ των ξενιστών. Με άλλα λόγια, ένας ιός δεν μπορεί να αυξήσει την ικανότητα προσαρμογής του ταυτόχρονα σε όλους τους πιθανούς ξενιστές του, γεγονός το οποίο έχει ως συνέπεια τη δημιουργία εξειδίκευσης του σε ένα φυτό-ξενιστή ή/και μεταξύ συγγενικών ειδών ξενιστών. Εάν η προσαρμογή σε έναν ξενιστή “κοστίζει” στην ικανότητα προσαρμογής σε εναλλακτικούς ξενιστές, τότε αυτό αποτελεί τη βασική αρχή της προσαρμοστικής εναλλαγής μεταξύ των ξενιστών (*Sacristán et al., 2005*). Τέλος, ένα από τα ουσιαστικά προβλήματα που καλείται να αντιμετωπίσει ένας ιός, ο οποίος μεταδίδεται από έναν πρωταρχικό ξενιστή σε έναν νέο, είναι εάν οι μεταλλαγές που θα ευνοήσουν την προσαρμογή του στον νέο ξενιστή, θα μειώσουν και την ικανότητα προσαρμογής του στον πρωταρχικό. Η φύση και η διαδικασία αυτών των εναλλαγών και ο τρόπος που επιδρούν στη μετάδοση των φυτικών ιών αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας.

1.8.3 Προσαρμογή και εύρος-ξενιστών του PVY

Το πρότυπο της εξέλιξης του εύρους των ξενιστών του PVY φαίνεται να ανταποκρίνεται σε αλλαγή ξενιστή, καθώς απομονώσεις προσαρμοσμένες στο φυτό-ξενιστή *Capsicum annuum* (πιπεριά), οι οποίες ανήκουν στις ομάδες C1 και Chile, δεν εμφανίζονται συχνά σε καλλιέργειες *Solanum tuberosum* (πατάτα) (Moury, 2010). Από την άλλη μεριά, απομονώσεις του PVY, οι οποίες ανήκουν στις ομάδες C2, O και N, δεν παρουσιάζουν ικανότητα μόλυνσης στη πιπεριά (Fereres et al., 1993). Παρόλα αυτά, και ενώ όπως αναφέρθηκε η κύρια ομάδα απομονώσεων που προέρχονται από το φυτό-ξενιστή πιπεριά είναι η C1, δύο απομονώσεις της ομάδας N (Margaritopoulos et al., 2010) και μία της ομάδας O (Ibaba and Gubba, 2011) χαρακτηρίστηκαν ως εξαιρέσεις σε αυτήν την κυριαρχία της ομάδας C1 (Moury et al., 2017). Συμπερασματικά, η ανάλυση των παραπάνω στοιχείων, προσαρμόζει εκ νέου την σημερινή άποψη της ύπαρξης εμποδίων που διέπουν την εναλλαγή ξενιστών του PVY, δημιουργώντας την ανάγκη για την επανεξέταση των κριτηρίων διαφοροποίησης των ομάδων του PVY με βάση τόσο το εύρος των ξενιστών, όσο και την προέλευση της εκάστοτε απομόνωσης (Moury et al., 2017).

Σε ότι αφορά την προσαρμοστικότητα του PVY στο φυτό ξενιστή πιπεριά από άλλα είδη της οικογένειας Solanaceae η αμινοξική αλληλουχία της ιϊκής πρωτεΐνης P3, διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο, καθώς από μεταλλαγή στο κωδικόνιο 131 της P3, παρουσιάστηκε ικανότητα μόλυνσης της απομόνωσης N605 του PVY στη πιπεριά. Ακόμα, η μεταλλαγή His₁₃₁Tyr της P3 παρουσιάζεται σε ομάδες προσαρμοσμένες στο φυτό-ξενιστή πιπεριά, σε μία μεγάλη ποικιλία περιοχών προελεύσεως των απομονώσεων, ενώ δεν παρατηρήθηκε ευρέως σε απομονώσεις των φυτών-ξενιστών της πατάτας και του καπνού των ομάδων O και N (Vassilakos et al., 2016). Επίσης, συνεστιακή μικροσκοπία laser των απομόνωσης PVY-N και PVY-C1 που έφεραν το γονίδιο σήμανσης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Green Fluorescent Protein, GFP), έδειξε περιορισμό του πρώτου (απομόνωση N) σε μικρό αριθμό κυττάρων στα φύλλα πιπεριάς όπου πραγματοποιήθηκε η μηχανική μόλυνση με τον ιό, υποδεικνύοντας μειωμένη δυνατότητα διακυτταρικής μετακίνησης ή/και πολλαπλασιασμού των απομονώσεων της ομάδας N στη πιπεριά (Vassilakos et al., 2016). Από τα παραπάνω, και παρακολουθώντας την εξέλιξη της περιοχής του ιϊκού γονιδιώματος, από την οποία μεταφράζεται η πρωτεΐνη P3, κατά τη φυλογένεση του

PVY, προκύπτει ως συμπεράσματα ότι το φυτό ξενιστής πιπεριά αποτελεί δευτερεύοντα ξενιστή για τον PVY και, πως η προσαρμογή του PVY στον συγκεκριμένο ξενιστή επιτελέστηκε σε ένα μεγάλο εύρος ανεξαρτήτων γεγονότων (Vassilakos *et al*, 2016).

1.9 Στόχος της παρούσας εργασίας

Η δημιουργία μοριακών μοντέλων αλληλεπίδρασης των ιών με τα κύτταρα-ξενιστές τους αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στην έρευνα της βιολογίας συστημάτων, καθώς έτσι μπορεί να γίνει αντιληπτός ο τρόπος με τον οποίο οι ιοί χειραγωγούν τα κύτταρα προς όφελός τους, ελέγχοντας και διαταράσσοντας βασικά βιοσυνθετικά και μεταβολικά μονοπάτια, τα οποία σχετίζονται τυπικά με την εμφάνιση ασθένειας (Navratil *et al.*, 2011, Gulbahce *et al.*, 2012). Ωστόσο μέχρι σήμερα, σε αντίθεση με τους ανθρώπινους και τους ζωικούς ιούς, ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την εύρεση των μοριακών αλληλεπιδράσεων που καθορίζουν την προσαρμοστικότητα των φυτικών ιών στον ξενιστή τους. Η κλιματική αλλαγή και η παγκοσμιοποίηση του εμπορίου έχουν αυξήσει την επέκταση ή εισαγωγή μη ενδημικών ιών σε νέες περιοχές και συνεπώς, η κατανόηση των μηχανισμών προσαρμοστικότητας έχει καταστεί ακόμα πιο επιτακτική για την εκτίμηση της δυνατότητας των φυτικών ιών να μεταπηδήσουν σε νέους ξενιστές (host jump). Η γνώση αυτή θα επιτρέψει να προβλεφθούν εγκαίρως οι συνέπειες της μόλυνσης νέων ξενιστών από ένα ιό, για το φυτικό κεφάλαιο ή την οικολογία μιας περιοχής και να ληφθούν μέτρα αντιμετώπισης. Επιπλέον, με δεδομένο ότι θεραπευτικά μέτρα για τις ιολογικές ασθένειες των φυτών δεν είναι διαθέσιμα, ο εντοπισμός των φυτικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις και καθορίζουν αν ένα φυτικό είδος θα αποτελέσει ξενιστή για ένα συγκεκριμένο είδος ή γένος φυτικών ιών αποτελεί προϋπόθεση για την ανάπτυξη καινοτόμων, φιλικών προς το περιβάλλον στρατηγικών αντιμετώπισής τους. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν για τους παράγοντες που καθορίζουν τη δυνατότητα ενός φυτικού ιού να μεταπηδήσει και να προσαρμοστεί σε ένα νέο ξενιστή. Στο τομέα αυτό ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του PVY. Από τις τέσσερις κύριες φυλογενετικές ομάδες O, N, C1 και C2 του ιού, οι απομονώσεις της ομάδας C1 μολύνουν με πολλή μεγαλύτερη συχνότητα διασυστηματικά το φυτό-ξενιστή

πιπεριά (*Capsicum annuum*) καθιστώντας το παθοσύστημα PVY-πιπεριάς ιδανικό για τη μελέτη των παραγόντων που καθορίζουν τη προσαρμοστικότητα ενός φυτικού ιού στον ξενιστή του. Το τελευταίο ισχύει ιδιαίτερα σε αντιπαράβολή με την ομάδα N, απομονώσεις της οποίας δεν έχουν βρεθεί στη πιπεριά. Πράγματι, πρόσφατα έχειδειχθεί ότι η γονιδιωματική περιοχή P3 του ιού η οποία εκτός της πρωτεΐνης P3 οδηγεί και στην παραγωγή της πρωτεΐνης P3N-PIPO, κατέχει κύριο ρόλο στη προσαρμοστικότητα του ιού στην πιπεριά (Vassilakos *et al*, 2016).

Η εργασία αυτή αποσκοπεί ακριβώς στην μελέτη φυτικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στις παραπάνω αλληλεπιδράσεις και βασίζεται στο πρόσφατο εντοπισμό της γονιδιωματικής περιοχής P3 του PVY που καθόρισε την ικανότητα του να προσαρμοστεί στον ξενιστή πιπεριά από άλλα καλλιεργούμενα φυτικά είδη της οικογένειας *Solanaceae* (Vassilakos *et al.*, 2016). Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη PCaP1 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη P3N-PIPO των ιών του γένους *Potyvirus*, καθορίζοντας με αυτό τον τρόπο την διακυτταρική μετακίνησή τους, τη καθιστά υποψήφια ως έναν από τους φυτικούς παράγοντες που πιθανόν καθορίζουν τη δυνατότητα του PVY να προσαρμοστεί στη πιπεριά. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε αναγνώριση της ορθόλογης πρωτεΐνης της PCaP1 στη πιπεριά, και στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος της στη διαδικασία μόλυνσης του PVY στο συγκεκριμένο ξενιστή με χρήση VIGS. Παράλληλα για τη περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου κάθε μίας των πρωτεϊνών P3 και P3N-PIPO του PVY στην προσαρμοστικότητα του, δημιουργήθηκε σημειακή μετάλλαξη στη γονιδιωματική περιοχή της P3 ώστε να καταστεί δυνατή η έκφραση της πρωτεΐνης P3N-PIPO σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης με σκοπό τη πραγματοποίηση πειραμάτων συμπληρωματικότητας.

Η παρούσα εργασία περιλαμβάνει στάδια μιας ευρύτερης έρευνας που αποσκοπεί στην αναγνώριση των φυτικών παραγόντων που συμμετέχουν στην προσαρμογή των ιών του γένους *Potyvirus* σε ένα νέο ξενιστή, με σκοπό τη μελλοντική δημιουργία φυτών ανθεκτικών στους συγκεκριμένους ιούς.

Κεφάλαιο 2.

Υλικά και μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό και ιικές απομονώσεις

Ως κύριο φυτικό υλικό στη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η ποικιλία πιπεριάς, *Capsicum annuum* cv. Yolo Wonder, καθώς και οι ποικιλίες Doux des Landes και Phyto636 που παραχωρήθηκαν από το INRA PACA, Avignon, France (Dr B. Moury). Επίσης, η *N. benthamiana*, χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας των ιικών μολύνσεων και σαν ο ξενιστής διατήρησης και πολλαπλασιασμού των ιών.

Οι ιοί ήταν οι πλήρους μήκους μολυσματικοί κλώνοι των απομονώσεων N605 και SON41 του PVY (των ομάδων N και C1 αντίστοιχα), τόσο αγρίου τύπου όσο και τροποποιημένοι ώστε να φέρουν τη πρωτεΐνη σήμανσης Green Fluorescence Protein (GFP) και παραχωρήθηκαν επίσης από το INRA PACA. Ο TRV-PpK20 είναι μια νηματωμεταδιδόμενη απομόνωση του ιού του κροταλίσματος του καπνού (*Tobacco rattle virus*, TRV), και ένας μολυσματικός cDNA κλώνος του RNA2 παραχωρήθηκε από τον Δρ SA MacFarlane, (The James Hutton Institute, Scotland) (πλασμίδιο P0111). Μεταγραφήματα του RNA2 του TRV-PpK20 συντέθηκαν *in vitro* χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια του εμπορίου (Ambion) όπως περιγράφηκε από τους Vassilakos et al. (2001) (βλέπε παρακάτω). Στη συνέχεια, τα μεταγραφήματα του RNA2 που προήλθαν από το πλασμίδιο P0111 αναμείχθηκαν με NM RNA του TRV-PpK20 (TRV-RNA1 μόνο), (Harrison et al., 1983). Με το μείγμα των παραπάνω RNAs μολύνθηκαν φυτά *N. benthamiana* και 7 ημέρες αργότερα τα μολυσμένα πλέον φυτά συλλέχθηκαν, ομογενοποιήθηκαν και καταψύχθηκαν σε δόσεις του 1,5 ml οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μόλυσμα για μηχανικές μολύνσεις. Ο TRV χρησιμοποιήθηκε ως ετερόλογος ιικός φορέας έκφρασης για VIGS με αντικατάσταση του *gfp* γονιδίου που έφερε από αλληλουχίες του ενδιαφέροντός μας ύστερα από πέψη με περιοριστικά ένζυμα και επανακλωνοποίηση (βλέπε παρακάτω).

2.2 Μηχανικές μολύνσεις και συνθήκες ανάπτυξης των φυτών

Χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιημένος σε ρυθμιστικό διάλυμα φυτικός ιστός φύλλων *N. benthamiana* μολυσμένων με τον κατάλληλο για το κάθε πείραμα ιό. Για την αποτελεσματικότερη μόλυνση χρησιμοποιήθηκε, μαζί με το μόλυσμα, αποξηστικό ορυκτό υλικό σε μορφή πούδρας (carborundum) ώστε να προκληθούν μικροπληγές στο φυτικό ιστό και να εισέλθει ευκολότερα ο ιός στα φυτικά κύτταρα (Costa and Franko, 1950). Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν στις κοτυληδόνες και στα δύο πρώτα πραγματικά φύλλα των φυτών. Μετά από δύο περίπου λεπτά τα φύλλα ξεπλύθηκαν με νερό. Η ομογενοποίηση του φυτικού ιστού πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα με σύσταση:

Na ₃ PO ₄ · 12H ₂ O,	0,57 g
Dieca*	0,1 g
Type 1 Ultrapure water (H ₂ O)	50 ml

*διαιθυλοδιθειοκαρβαμικό οξύ

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε εντομοστεγές θερμοκήπιο με συμπληρωματικό φωτισμό για να επιτευχθεί φωτοπερίοδος 16/8 ώρες ημέρα / σκότος και με θερμοκρασίες που κυμαίνονταν μεταξύ 21 και 27 °C.

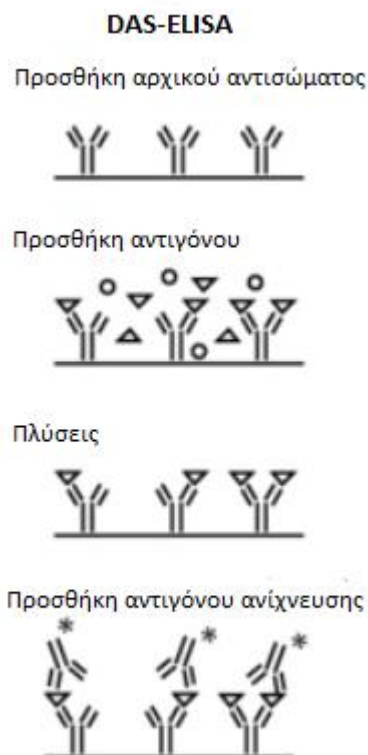
2.3 Έλεγχος των ιϊκών μολύνσεων

Ο έλεγχος και η εξέλιξη των ιϊκών μολύνσεων πραγματοποιήθηκε α) με παρατήρηση της εμφάνισης συμπτωμάτων, β) παρατήρηση της παρουσίας του ιού εντός του φυτού, με χρήση λυχνίας υπέρυθρης ακτινοβολίας (Ultra Violet, UVP) στις περιπτώσεις που οι ιϊκές απομονώσεις έφεραν σήμανση με GFP και γ) με τη χρήση της ανοσολογικής μεθόδου DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich – Enzyme – Linked Immunosorbent Assay) (Clark and Adams, 1977).

Η DAS-ELISA πραγματοποιήθηκε με εμπορικά σκευάσματα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Loewe Biochemica GmbH). Θετικά θεωρήθηκαν δείγματα των οποίων η τιμή της οπτικής απορρόφησης A_{405} , ήταν μεγαλύτερη του διπλάσιου του μέσου όρου της απορρόφησης των αρνητικών μαρτύρων. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σε δύο ημέρες. Την πρώτη ημέρα οι κυψελίδες της πλάκας καλύπτονται με 100μl/κυψελίδα από αντισώμα IgG σε συγκέντρωση σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας, για τον συγκεκριμένο κάθε φορά ιό, σε ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης (coating buffer)¹ και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 3 ώρες. Αμέσως μετά, η πλάκα ξεπλένεται τρεις φορές από 5' τη φορά, με διάλυμα PBS-Tween². Κατόπιν, προστίθενται σε κάθε κυψελίδα 100μl από το μίγμα του αντιγόνου το οποίο αποτελούταν από φυλλικό ιστό ο οποίος ομογενοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής του δείγματος (sample buffer)³ σε αναλογία 1:10 w/v. Η πλάκα τοποθετήθηκε στους 4°C και επώαστηκε για όλη τη νύχτα.

Την επόμενη ημέρα η πλάκα ξεπλένεται τρεις φορές από 5' τη φορά με διάλυμα PBS-Tween. Στη συνέχεια προστίθενται σε κάθε κυψελίδα από 100μl συζεύγματος αντισώματος-αλκαλικής φωσφατάσης (IgG-alkaline phosphatase conjugate) σε ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής και η πλάκα επωάζεται στους 37°C για τρεις ώρες (σε συγκέντρωση που ορίζει η παρασκευάστρια εταιρεία). Μετά από ξέπλυμα, προστίθενται 200 μl υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης PNPP (1 mg/ml σε διάλυμα υποστρώματος⁴ και η πλάκα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα.

Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φωτόμετρο BIO-RAD iMark™ Microplate Reader στα 405nm.



Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση αρχής μεθόδου DAS-ELISA.

¹coating buffer: 1,59 g/L Na_2CO_3 , 2,93 g/L NaHCO_3 σε ddH₂O (τελικό pH=9.6)

² PBS-tween: 8 g /L NaCl, 0,2 g/L KCl, 2,9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, 0,2 g/L KH_2PO_4 , 0,5 ml/L Tween 20 σε type 3 H₂O (pH=7,2-7,4)

³sample buffer: 20 g/L polyvinyl pyrrolidone, 2g/L bovine serum albumin, 0,1 g/L NaN_3 (pH=7,4)

⁴substrate buffer: 97 ml/L diethanolamine, 0,2 g/L $\text{MgCl} \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (pH=9,8)

2.4 Εξαγωγή ολικού φυτικού RNA

Η εξαγωγή φυτικού ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με χρήση αντιδραστηρίου TRI (Ambion) ακολουθώντας τις οδηγίες της εταιρείας. Συγκεκριμένα, 50-100 mg φυλλικού ιστού με τη μορφή μικρών δίσκων τοποθετήθηκαν σε μικροσωληνίσκους 1.5 ml (Eppendorf) και καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο. Ακολούθησε ομογενοποίηση σε λεπτή σκόνη των δειγμάτων με ραβδάκια ομογενοποίησης, προσθήκη 1 ml TRI σε κάθε δείγμα και έντονη ανάδευση για 1 min. Τα δείγματα αφέθηκαν 5 min σε ηρεμία (θερμοκρασία δωματίου) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 11.000 στροφές/min (rpm) στους 4°C, για 15 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέους

μικροσωληνίσκους, και προστέθηκαν 200 μl χλωροφορμίου. Έγινε ανάμειξη και τα δείγματα αφέθηκαν 15 min σε ηρεμία (θερμοκρασία δωματίου) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέους μικροσωληνίσκους, προστέθηκε ίσος συνολικός όγκος φαινόλης/χλωροφόρμιου (1:1) και ακολούθησε ανάδευση. Μετά από 5-10 min ηρεμίας σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέους μικροσωληνίσκους.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση για 15 sec. Ύστερα από 10 min σε θερμοκρασία δωματίου έγινε νέα φυγοκέντρωση, απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα του κατακρημνισμένου RNA σε 1 ml 75% παγωμένης αιθανόλης. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση, απομάκρυνση της αιθανόλης και αναμονή μέχρι να εξατμιστεί πλήρως, και αναδιάλυση του κατακρημνισμένου RNA σε 20 μl υπερκάθαρου νερού (Type 1 Ultrapure water; Direct-Q 3 UV Water Purification System, Merck). Η ποσότητα του RNA προσδιορίστηκε με σπεκτροφωτόμετρο πολύ μικρών όγκων IMPLEN P330 σε μήκος κύματος 260 nm και η καθαρότητα του με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν μέχρι τη χρήση τους στους -30°C ή -80°C .

2.5 Πέψη με DNase

Μετά την εξαγωγή των RNA με TRI, για όσα δείγματα προορίζονταν να αναλυθούν με RT-qPCR πραγματοποιήθηκε πέψη με DNase (Promega) ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα ολικού φυτικού DNA. Γενικά, έγινε πέψη με μία μονάδα (1 unit) ενζύμου ανά mg RNA. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 και με 6 μl DNase (1 unit/μl) για πέψη περίπου 6 mg RNA. Η επώαση έγινε στους 37°C για 15 min, και η απομάκρυνση της DNase πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης/χλωροφόρμιου (1:1) που ακολουθήθηκε με κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη 2.5 όγκων (σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) 100% παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου 3M NaOAc (pH 5,2).

Το διάλυμα τοποθετήθηκε στους -80°C για 1 ώρα και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 20 min. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το κατακρημνισμένο RNA

ξεπλύθηκε με 70% παγωμένης αιθανόλης και έγινε νέα φυγοκέντρωση. Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης και αναμονή μέχρι να εξατμιστεί πλήρως έγινε αναδιάλυση του κατακρημνισμένου RNA σε 5-10 μl υπερκάθαρου νερού. Η ποσότητα του RNA προσδιορίστηκε ξανά σε σπεκτροφωτόμετρο όπως περιγράφηκε προηγουμένως και τα RNA αποθηκεύτηκαν μέχρι τη χρήση τους στους -80 °C.

2.6 Αντίστροφη μεταγραφή

Η αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) έχει ως σκοπό να συνθέσει εξειδικευμένα από το RNA στόχο, συμπληρωματικό DNA (cDNA) ώστε στη συνέχεια καθορισμένο τμήμα του να πολλαπλασιαστεί με τη μέθοδο της PCR. Το ένζυμο, το οποίο χρησιμοποιείται σε αυτή τη διαδικασία, ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση. Η πρώτη φορά, που απομονώθηκε το συγκεκριμένο ένζυμο, ήταν το έτος 1970 από ρετροιούς, ενώ έκτοτε αποτελεί σημαντικό εργαλείο για τη μοριακή βιολογία. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιεί RNA ως “καλούπι” για τη σύνθεση της συμπληρωματικής ως προς σε αυτό, DNA αλυσίδας.

Η RT πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια, ουσιαστικά σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας του ενζύμου (SuperScript™ II, INVITROGEN™).

Πίνακας 2.1: Πρωτόκολλο αντίστροφης μεταγραφής

Στάδιο 1^ο: Αποδιάταξη ολικού RNA και υβριδισμός εκκινητών	Προσθήκη σε Eppendorf 0,1 - 0,5 µg ολικού RNA και 2 pmole ειδικού για το γονίδιο PCaP1 εκκινητή ¹ ή μείγμα OligoDT ² (τελικής συγκέντρωσης 5 µM), σε type 1 H ₂ O με τελικό όγκο 12 µl.	Ανάδευση και επώαση μείγματος στους 65 °C για 5 min
Στάδιο 2^ο: RNA-εξαρτώμενη ενίσχυση του DNA	Προσθήκη 5 µl 5 x FS buffer ³ , 2 µl 0,1 M DTT ⁴ , 0,4 µl dNTP's ⁵ , 1 µl RNaseOUT™ (40 units/µL) ⁶ και 1 µl SuperScript™ II (200 units). Τελικό όγκος αντίδρασης 20 µl.	Ανάδευση και επώαση δείγματος στους 42°C για 50 min (στην περίπτωση των εκκινητών OligoDT) ή στους 50°C για 50 min (στην περίπτωση του εκκινητή του γονιδίου PCaP1)
Στάδιο 3^ο: Αποθήκευση	Προσθήκη 80 ml Type 1 H ₂ O.	Αποθήκευση μείγματος στους -20°C

¹Εκκινητής ειδικός για το γονίδιο PCaP1: Pcap1Ca1REV:CTAAGCCTTTGATGGTGCTGGT

²Το μείγμα των εκκινητών OligoDT αποτελείται από τους εκκινητές OligoDT₁₆, OligoDT₁₈ και OligoDT₂₀, τα οποία αποτελούνται από 16,18 και 20 μόρια θυμίνης αντίστοιχα και υβριδίζονται στην πολύ-A περιοχή των mRNA.

³5x First-Strand buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)

⁴Διθειοθρεϊτόλη: χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών, που περιέχουν σουλφυδρυλομάδες.

⁵Το μείγμα dNTP's αποτελείται από dATP, dCTP, dGTP και dTTP, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση του DNA προϊόντος

⁶RNaseOUT™ έχει τη λειτουργία αναστολέα RNAασης, δηλαδή μπορεί και συνδέεται με την RNAαση και να παρεμποδίζει τη λειτουργία της.

2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η οποία αναπτύχθηκε πρώτη φορά από τον Kary Mullis το έτος 1983 (*Mullis et. Al, 1986*), είναι μία μέθοδος πολλαπλασιασμού ενός ή μερικών αντιγράφων συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε χιλιάδες ή εκατομμύρια αντίγραφα. Το ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι μία DNA πολυμεράση, η οποία απομονώθηκε πρώτη φορά από το μικροοργανισμό *Thermus aquaticus*. Σε κάθε PCR χρησιμοποιείται ένα συγκεκριμένο ζευγάρι εκκινητών για την ενίσχυση της αλληλουχίας του ενδιαφέροντος μας. Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτίδια, συνήθως 17 – 30 ζεύγη βάσεων, συμπληρωματικά προς το 3' και 5' άκρο της αλληλουχίας που ενισχύεται. Ένα γενικό πρωτόκολλο της μεθόδου PCR μπορεί να περιγραφεί σε 4 στάδια (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Γενικό πρωτόκολλο PCR

Στάδιο 1^ο:	Αρχική αποδιάταξη του DNA εκμαγείου στους 94 °C για 2 min
Στάδιο 2^ο: (25 – 40 κύκλοι)	• Αποδιάταξη του DNA εκμαγείου στους 94 °C για 30 sec • Υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες για 30 sec¹ • Ενίσχυση του τελικού προϊόντος της PCR²
Στάδιο 3^ο:	Τελική επέκταση του προϊόντος για 5 – 10 min
Στάδιο 4^ο:	Αποθήκευση του ενισχυμένου DNA τμήματος στους -20 °C

¹Η θερμοκρασία προσαρμογής των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλυσίδες εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (melting temperature, T_m).

²Η θερμοκρασία της ενίσχυσης του τελικού προϊόντος εξαρτάται από την πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιείται σε κάθε PCR, ενώ ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του PCR προϊόντος. Συνήθως, 1 min είναι αρκετό για την αντιγραφή 1000 ζευγών βάσεων.

2.7.1. Ενίσχυση της πλήρους αλληλουχίας του γονιδίου *PCaP1*

Συστατικά μείγματος αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
10 X PCR buffer(δεν περιέχει Mg)	1X (2.5 μ l)
50 mM MgCl ₂	1,25 mM
cDNA	<250 ng
Μείγμα dNTP's	0,2 mM
20 μ M (forward) εκκινητής	0.5 μ M
20 μ M (reverse) εκκινητής	0.5 μ M
<i>Taq</i> DNA πολυμεράση (INVITROGEN) 5 units/ μ l	1,25 units
Type 1 H ₂ O	μέχρι 25 μ l (τελικός όγκος αντίδρασης)

Πρόγραμμα:

Στάδιο 1^ο	94 °C για 3 min
Στάδιο 2^ο (3 κύκλοι)	92 °C για 20 sec 45 °C για 20 sec 72 °C για 90 sec
Στάδιο 3^ο (40 κύκλοι)	92 °C για 20 sec 58 °C για 30 sec 72 °C για 90 sec
Στάδιο 4^ο	72 °C για 5 min
Στάδιο 5^ο	4 °C

Εκκινητές:

Pcap1Ca1FOR: 5'-ATGGGATACTGGAAAGCAAAAGT-3'

Pcap1Ca1REV: 5'-CTAAGCCTTTGATGGTGCTGGT-3'

2.7.2. Ενίσχυση τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου *PCaP1* για χρήση VIGS και των περιοχών που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες CP και P3 του PVY-SON41 για την ετερόλογη έκφρασή τους μέσω ιϊκού φορέα

Συστατικά μείγματος αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
10 X <i>Pfx</i> Amplification Buffer	1X (5 μ l)
50 mM MgSO ₄	1 mM
cDNA	<250 ng
Μείγμα dNTP's	0,3 mM
20 μ M (forward) εκκινητής	0.3 μ M
20 μ M (reverse) εκκινητής	0.3 μ M
Platinum™ <i>Pfx</i> DNA proofreading πολυμεράση (INVITROGEN)	1unit
Type 1 H ₂ O	μέχρι 50 μ l (τελικός όγκος αντίδρασης)

Πρόγραμμα:

Στάδιο 1°	94 °C για 3 min
Στάδιο 2° (35κύκλοι)	94 °Cγια 15sec 58 °Cγια 30 sec 68 °C για 1 min
Στάδιο 3°	68 °C για 5 min
Στάδιο 4°	4°C

Εκκινητές:

- Για το γονίδιο *pcpa1*:

Pcap1NcoIFOR: 5'ACG**CCATGG**TTTCCTTGATGAGCTTGTCAA.3'

NcoI

Pcap1KpnIREV: 5'CC**GGTAC**CTGCTGCTTCAACAACCTATGT.3'

KpnI

- Για το γονίδιο της ιϊκής πρωτεΐνης CP:

CPFW: 5CGG**CCATGG**GCAAATGATACAATTGATGCTG₃,

NcoI

CPREV: 5CC**GGTACC**TTACATGTTCTTGACTCCAAGTAG₃,

KpnI

- Για το γονίδιο της ιϊκής πρωτεΐνης P3:

SON41P3BamHI-FW: 5CGC**GGATCC**ATGGGTGTTCTTAATGCATGCCCT₃,

BamHI

SON41P3REV: 5CC**GGTACC**TTACTGGTGTCTCGCACTTCATGTTCT₃,

KpnI

2.8 PCR αλληλοεπικαλυπτόμενης επέκτασης (Overlap extension PCR, OE-PCR)

Η συγκεκριμένη μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Higuchi et al. το 1988. Όπως και στις περισσότερες αντιδράσεις PCR, δύο εκκινητές απαιτούνται για την κάθε ακολουθία. Για την προσθήκη μίας σημειακής μεταλλαγής, σχεδιάζονται δύο ζεύγη εκκινητών, όπου ο 5' εκκινητής του ενός ζεύγους φέρει τη σημειακή μεταλλαγή και είναι συμπληρωματικός του 3' εκκινητή του δεύτερου ζεύγους. Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την ίδια αλληλουχία DNA, για κάθε ζεύγος εκκινητών γίνεται μία αντίδραση PCR. Τα προϊόντα των αντιδράσεων που προκύπτουν αποτελούν το DNA εκμαγείο σε μία τρίτη αντίδραση PCR, η οποία έχει τους εκκινητές της συνολικής αλληλουχίας DNA.

Για την δημιουργία σημειακής μεταλλαγής (προσθήκη ενός μορίου αδεΐνης) στο συντηρημένο GA₇ μοτίβο της ιϊκής πρωτεΐνης P3N-PIPO του ιού PVY εφαρμόστηκε η παραπάνω μέθοδος με χρήση της Platinum™ Pfx DNA πολυμεράσης (INVITROGEN™).

Πρόγραμμα 1^{ης} και 2^{ης} αντίδρασης PCR:

Στάδιο 1^ο	94 °C για 2 min
Στάδιο 2^ο (35 κύκλοι)	94 °C για 15sec 58 °C για 30 sec 68 °C για 1 min
Στάδιο 3^ο	68 °C για 5 min
Στάδιο 4^ο	4°C

Εκκινητές:

- Για τη 1^η αντίδραση PCR:

SON41P3BamHI-FW: 5CGC**GGATCC**ATGGGTGTTCTAATGCATGCCCT₃,
BamHI

PIPOFUS-REV¹: 5ATCTAGATAATTT**TTTTT**CCATAATCTGTA₃,

- Για τη 2^η αντίδραση PCR:

PIPOFUS-FW¹: 5TACAGATTATGGAAA**A**AAAATTATCTAGAT₃,

SONP3-PIPOREV: 5CC**GGTACC**TC**ACT**CAAACCTGAAGTAGTGT₃,
KpnI

Πρόγραμμα 3^{ης} αντίδρασης PCR²:

Στάδιο 1^ο	94 °C για 2 min
Στάδιο 2^ο (5 κύκλοι)	94 °C για 15sec 50 °C για 20sec 68 °C για 1,5 min
Στάδιο 3^ο (35 κύκλοι)	94 °C για 15 sec 50 °C για 30 sec 68 °C για 1,5 min
Στάδιο 4^ο	4°C

Εκκινητές:

SON41P3BamHI-FW: ₅CGC**GGATCC**ATGGGTGTTCTAATGCATGCCCT₃,
BamHI

SONP3-PIPOREV: ₅CC**GGTACC**TCACTCAAACCTGAAGTAGTGT₃,
KpnI

¹Η σημειακή μεταλλαγή διαγράφεται με κόκκινο.

² Το DNA που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο, ήταν τα προϊόντα των δύο πρώτων αντιδράσεων PCR. Οι εκκινητές της αντίδρασης προστέθηκαν στο 2^ο στάδιο.

2.9 Ηλεκτροφόρηση DNA

Τα δείγματα του DNA αναμείχθηκαν (1:5) με ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0.25% (w/v) bromophenol blue και 30 % γλυκερίνη και ηλεκτροφορήθηκαν σε 1-1,2% πήγμα αγαρόζης παρασκευασμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE¹. Στο πήγμα είχε προστεθεί ποσότητα 0,5-1 mg/ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide) ώστε να είναι ορατό το DNA κάτω από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Ultra Violet, UV).

Το μέγεθος σε αριθμό ζευγών βάσεων του DNA εκτιμήθηκε από τη σύγκριση του με τη κλίμακα καθορισμένου αριθμού ζευγών βάσεων τμημάτων DNA που ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα (1 kb Ladder).

¹Ρυθμιστικό διάλυμα 50X TAE:

- 242 g Tris-base,
- 57.1 ml Glacial Acetic Acid,
- 100 mL EDTA (0.5 M, pH 8),
- dH₂O για τελικό όγκο διαλύματος 1 L

2.10 Ποσοτική-πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative-real time PCR, qPCR)

Η εμφάνιση της μεθόδου της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) ή PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) συνδυασμένης με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) έχει δραματικά αλλάξει τον τομέα της μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης.

Η qPCR είναι η τεχνική της συλλογής δεδομένων κατά τη διαδικασία της PCR όπως αυτή λαμβάνει χώρα και συνεπώς συνδυάζει ενίσχυση και ανίχνευση μέσα από ένα μονό βήμα. Αυτό πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας μια ποικιλία από διαφορετικές φθορίζουσες χημικές ουσίες που συσχετίζουν την συγκέντρωση του προϊόντος της PCR και την ένταση του φθορισμού. Οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από το χρονικό σημείο (ή κύκλο της PCR) κατά το οποίο ο στόχος της ενίσχυσης πρωτοανιχνεύεται. Αυτό το μέγεθος συνήθως αναφέρεται ως κατώτατο όριο (ή κατώφλι) κύκλου (cycle threshold, Ct), και αντιστοιχεί στη στιγμή που η ένταση του φθορισμού γίνεται μεγαλύτερη από αυτή του περιβάλλοντος της αντίδρασης ή του υποβάθρου (background fluorescence). Συνεπώς, όσο είναι μεγαλύτερη η ποσότητα του DNA στόχου στο αρχικό υλικό, τόσο γρηγορότερα μια σημαντική αύξηση στο φθορίζον σήμα θα εμφανιστεί, παράγοντας ένα χαμηλότερο Ct.

Η PCR μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις κυρίως φάσεις: την επίπεδη γραμμική φάση, τη πρώιμη εκθετική, τη λογαριθμική (γνωστή και ως εκθετική) και τη φάση κορεσμού. Κατά τη διάρκεια της επίπεδης γραμμικής φάσης (συνήθως στους 10-15 πρώτους κύκλους) η PCR μόλις ξεκινάει και ο φθορισμός σε κάθε κύκλο δεν έχει ακόμα αυξηθεί πάνω από το υπόβαθρο. Η βασική γραμμή του φθορισμού υπολογίζεται τη στιγμή αυτή. Στην πρώιμη εκθετική φάση, η ποσότητα του φθορισμού έχει φτάσει ένα κατώφλι στο οποίο είναι σημαντικά υψηλότερη (συνήθως 10 φορές από το μέσο όρο του φθορισμού της επίπεδης γραμμικής φάσης) από το επίπεδο φθορισμού του υποβάθρου. Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό είναι γνωστός ως κατώτατο όριο κύκλου (cycle threshold, Ct). Αυτή η τιμή είναι αντιπροσωπευτική του αρχικού αριθμού αντιγράφων DNA στο αρχικό δείγμα και

χρησιμοποιείται για να υπολογίσει πειραματικά αποτελέσματα. Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης η PCR φθάνει στην βέλτιστη περίοδο ενίσχυσης του προϊόντος.

Τελικά, η φάση κορεσμού λαμβάνει χώρα όταν τα συστατικά της αντίδρασης γίνονται περιορισμένα ενώ η ένταση του φθορισμού δεν είναι πια χρήσιμη για τον υπολογισμό των δεδομένων. Οι μορφές ποσοτικοποίησης της qPCR είναι η απόλυτη και η σχετική ποσοτικοποίηση. Οι χημείες ανίχνευσης βασίζονται σε α) δεσμευόμενες στο DNA χρωστικές ουσίες, β) ανιχνευτές υβριδοποίησης, γ) ανιχνευτές υδρόλυσης και δ) ανιχνευτές σε μορφή φουρκέτας (όπως Scorpions, εκκινητές SunriseTM, εκκινητές LUXTM).

Πιο συγκεκριμένα, οι DNA-δεσμευόμενες χρωστικές ουσίες εκπέμπουν φθορισμό όταν δεσμεύονται στο dsDNA. Καθώς το προϊόν της PCR, που έχει τη μορφή dsDNA, αυξάνεται κατά την διάρκεια των επαναλήψεων των κύκλων, περισσότερη χρωστική ουσία δεσμεύεται και εκπέμπει περισσότερο φθορισμό. Για το λόγο αυτό, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται αναλογικά με την συγκέντρωση του dsDNA. Όμως για αξιόπιστα αποτελέσματα με χρήση DNA-δεσμευόμενης χρωστικής ουσίας απαιτείται μια εξειδικευμένη PCR η οποία μπορεί να επιβεβαιωθεί μέσω της καμπύλης αποδιάταξης (με την οποία η παρουσία διαφορετικών προϊόντων PCR αντιστοιχεί σε διαφορετικές κορυφές τήξης).

2.10.1 Ποσοτικοποίηση των μεταγράφων του γονιδίου *PCaP1* και της PVY-SON41- P3

Συστατικά μείγματος αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
2X SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems TM)	1X (5 µl)
cDNA	15 ng
20 µM (forward) εκκινητής	150nM
20 µM (reverse) εκκινητής	150nM
Type 1 H ₂ O	μέχρι 10 µl (τελικός όγκος αντίδρασης)

Πρόγραμμα:

Στάδιο 1^ο	50 °C για 2 min 95 °C για 2 min
Στάδιο 2^ο (40 κύκλοι)	95 °C για 15sec 60 °C για 1 min
Στάδιο 3^ο	καμπύλη αποδιάταξης (60 °C – 95 °C)
Στάδιο 4^ο	4 °C

Εκκινητές:

- Για το γονίδιο *pcap1*:
PcaPqFOR: ACCAAAGGATGCAGGACTTAAGA
PcaPqREV: TACTGCTTTTCGATCCCGGAA
- Για την αλληλουχία PVY-SON41- P3:
SON41P3Qex-FW: GATGCTGCAGCCACAGATCTC
SON41P3Q2REV: CAACTTGCAACACCATCAGTGC
- Για το γονίδιο *ubi3*:
UBI3F: GCCGACTACAACATCCAGAAGG
UBI3R: TGCAACACAGCGAGCTTAACC

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε στη συσκευή STEP-ONE PLUS της Applied Biosystems™, και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος StepOne Software v2.2.2.

2.11 Καθαρισμός προϊόντος PCR

Για τον καθαρισμό ενός προϊόντος PCR και τη περαιτέρω χρησιμοποίησή του σε κλωνοποίηση ή απευθείας αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκαν τα συστήματα PureLink® PCR Purification (Invitrogen™) και Gel Extraction QIAquick® (Qiagen) ακολουθώντας τις οδηγίες των κατασκευαστών.

2.12 Αντίδραση λιγάσης και κλωνοποίηση σε φορέα pCR®II-TOPO®

Η σύνδεση μεταξύ δύο μορίων DNA, συνήθως ενός πλασμιδίου και ενός προϊόντος αντίδρασης PCR, πραγματοποιείται μέσω της ικανότητας της T₄ DNA λιγάσης να συνδέει μόρια DNA με συμπληρωματικά άκρα. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πλασμιδιακών κυκλικών μορίων με το επιθυμητό γονίδιο/τμήμα DNA. Η εκάστοτε αντίδραση σύνδεσης, στη συνέχεια χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli*, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό του τροποποιημένου πλέον πλασμιδίου.

Κατάλληλη ποσότητα¹, κατεργασμένων με περιοριστικά ένζυμα, μορίων πλασμιδιακού φορέα και της αλληλουχίας εισδοχής προστίθενται, μαζί με Type 1 H₂O, σε αντίδρασης με τελικό όγκο 10 μl. Στη συνέχεια και αφού προστεθούν 25 units T₄ DNA λιγάσης και ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης T₄ DNA, η αντίδραση επωάζεται στους 12°C για 16 h.

¹Η αναλογία της ποσότητας των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και της εισδοχής, υπολογίστηκε με βάση των παρακάτω τύπο:

Μοριακή αναλογία = Μέγεθος φορέα (Kb)*Ποσότητα εισδοχής (ng)/Μέγεθος εισδοχής (Kb)* Ποσότητα φορέα (ng)

Επίσης πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση προϊόντων PCR σε φορέα TOPO® TA Cloning® (INVITROGEN™) που φέρει στα 3' άκρα της περιοχής του μετασχηματισμού, ένα μόριο θυμίνης (T), το οποίο προεξέχει. Η Taq DNA πολυμεράση προσθέτει στο 3' άκρο του προϊόντος της αντίδρασης PCR στην οποία χρησιμοποιείται ένα μόριο αδενίνης (A) και συνεπώς είναι δυνατή η αντίδραση λιγάσης:

Συστατικά μείγματος αντίδρασης	Τελικός Όγκος
Προϊόν PCR	30-50 ng (0,5 – 4 μ l)
Διάλυμα αλάτων (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl)	1 μ l
pCR®II-TOPO® πλασμιδιακός φορέας	1 μ l (10 ng)
Type 1 H ₂ O	μέχρι 6 μ l (τελικός όγκος αντίδρασης)

Ακολούθησε επώαση στους 22 – 23 °C για 30 min και στη συνέχεια αποθήκευση στους -20 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή του. Εξαιτίας αυτού, Στις PCR αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε η Platinum™ Pfx DNA proofreading πολυμεράση, είναι απαραίτητη η προσθήκη μορίων αδεΐνης στα 3' άκρα του προϊόντος PCR σύμφωνα με την αντίδραση:

Συστατικά μείγματος αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
10X PCR buffer (δεν περιέχει Mg)	1X
50 mM MgCl ₂	1,5 mM
PCR προϊόν	500 ng
dATP's	0,2 mM
Taq DNA πολυμεράση (INVITROGEN) 5 units/ μ l	2,5 units
Type 1 H ₂ O	μέχρι 50 μ l (τελικός όγκος αντίδρασης)

Ακολουθούσε επώαση της αντίδρασης για 30 min στους 72 °C και στη συνέχεια αποθήκευση στους -20 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

2.13 Προετοιμασία κυττάρων *Escherichia coli* για ηλεκτροδιάτρηση

Πραγματοποιήθηκε σε στέλεχος DH5a ως εξής:

- Εμβολιασμός αποικίας *E. Coli* σε 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB¹. και επώαση στους 37 °C για 16 h
- Μεταφορά 5 ml υγρής καλλιέργειας σε 500 ml LB και επώαση στους 37 °C, έως ότου $A_{600}=0,5 - 0,7$.
- Μεταφορά της καλλιέργειας σε πάγο για 20 min. Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στα 4000 g για 15 min, στους 4 °C
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού, επαναδιάλυση των κυττάρων σε 500 ml παγωμένου διαλύματος γλυκερόλης 10% και φυγοκέντρηση στα 4000 x g για 15 min στους 4 °C. και
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 250 ml παγωμένου διαλύματος γλυκερόλης 10%. Φυγοκέντρηση στα 4000 x g για 15 min στους 4 °C και απομάκρυνση υπερκειμένου
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 20 ml παγωμένου διαλύματος γλυκερόλης 10%. Φυγοκέντρηση στα 4000 x g για 15 min στους 4 °C και απομάκρυνση υπερκειμένου
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 2 ml παγωμένου διαλύματος γλυκερόλης 10%. Μεταφορά σε μικροσωληνίσκους σε δόσεις των 50 μl, άμεση ψύξη σε υγρό άζωτο και αποθήκευση στους -80 °C

2.14 Μετασχηματισμός *E. coli* με ηλεκτροδιάτρηση

Ακολουθήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

- Επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5ata οποία είναι αποθηκευμένα στους -80 °C, διατηρούνται στον με πάγο μέχρι να ξεπαγώσουν.
- Μεταφορά 1 – 2 μl αντίδρασης λιγάσης σε 50 μl επιδεκτικών κυττάρων. Επώαση στον πάγο για 1 min.

- Μεταφορά σε παγωμένη μικροθήκη ηλεκτροδιάτρησης (BioRad). Ρύθμιση της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης MicroPulser (BioRad), μεταφορά της μικροθήκης στην ειδική υποδοχή και απελευθέρωση του παλμού.
- Πρόσθεση 1 ml θρεπτικού υλικού S.O.C²
- Μεταφορά του μείγματος σε δοχείο 20 ml τύπου universal και επώαση στους 37°C για 1 h με ανάδευση στις 200 rpm.
- Επίστρωση 200 µl του μείγματος σε τρυβλία, που περιέχουν, θρεπτικό μέσο LB, 0,5 % άγαρ, 100 µg/ml αμπικιλίνη και 80 µl Xgal
- Επώαση στους 37 °C για 16 h.

Προκειμένου να επιλεχθούν τα μετασχηματισμένα κύτταρα, το μέσο ανάπτυξης LB περιείχε αμπικιλίνη και Xgal με σκοπό οι αποικίες, οι οποίες δεν είχαν μετασχηματιστεί έχουν μπλε χρώμα σε αντίθεση με τις μετασχηματισμένες λευκές.

¹LB μέσο ανάπτυξης (Luria Broth medium) για καλλιέργεια κυττάρων *E.coli* (Bertani, 1991):

- 10 g/L Tryptone
- 10 g/L Sodium chloride
- 5 g/L YeastExtract
- dH₂O για τελικό όγκο διαλύματος 1 L
- Για τη δημιουργία τρυβλίων, γίνεται προσθήκη 1.4% Agar
- Αποστείρωση στους 121 °C για 20 min

²Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) (Douglas Hanahan, 1983):

- 20 g/L Tryptone
- 5 g/L YeastExtract
- 10 mM διαλύματος NaCl
- 2,5 mM διαλύματος KCl
- 10 mM διαλύματος MgCl₂
- 10 mM διαλύματος MgSO₄
- dH₂O για τελικό όγκο διαλύματος 1 L
- Αποστείρωση στους 121°C για 20 min
- 20 mM διαλύματος γλυκόζης

2.15 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli* ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης (Birnboim and Doly, 1979):

- Μεταφορά 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας σε μικροσωληνίσκο συλλογής και στη συνέχεια φυγοκέντρωση σε 17900 g για 5 min.
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 100 μl διαλύματος A¹.
- Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 200 μl διαλύματος B² και ήπια ανάδευση,
- Μεταφορά 150 μl διαλύματος Γ³. Φυγοκέντρωση του διαλύματος σε 17900 g για 15 min και μεταφορά των 400 μl του υπερκειμένου σε νέο μικροσωληνίσκο συλλογής.
- Προσθήκη 800 μl ισοπροπανόλης, ανάδευση και φυγοκέντρωση του διαλύματος σε 17900 g για 10 min.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl Type 1 H₂O.
- Προσθήκη 100 μl LiCl 4M, επώαση για 10 min στον πάγο και φυγοκέντρωση σε 17900 g για 5 min.
- Μεταφορά 200 μl υπερκειμένου σε νέο μικροσωληνίσκο συλλογής και κατακρήμνιση με απόλυτη αιθανόλη του πλασμιδιακού DNA όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Επαναδιάλυση του πλασμιδιακού DNA σε 50 μl Type 1 H₂O και αποθήκευση στους -20 °C.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN) που βασίζεται στην ίδια αρχή, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

¹Διάλυμα A:

- 50 mM γλυκόζη
- 25 mM Tris – HCl, pH 8
- 10 mM EDTA

²Διάλυμα Β:

- 0,2 M NaOH
- 1% SDS

³Διάλυμα Γ:

- 3 M οξικού καλίου (CH₃COOK)
- 2 M οξικού οξέος (CH₃COOH)

2.16 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Τα περιοριστικά ένζυμα έχουν την ικανότητα να ‘κόβουν’ ένα τμήμα DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας, οι πλασμιδιακοί φορείς και τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR έπρεπε να πεπτούν με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα ώστε είτε να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα, στην περίπτωση κλωνοποιήσεων ή να δημιουργηθούν γραμμικοί ιικοί φορείς, με σκοπό την παραγωγή RNA μεταγράφων.

Το κλωνοποιημένο RNA2 του TRV (P0111) περιείχε στην αλληλουχία του το γονίδιο *gfp*. Στα άκρα του γονιδίου αυτού υπήρχαν οι περιοχές αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NcoI* και *KpnI*. Για αυτόν το λόγο και με σκοπό την εισαγωγή των αλληλουχιών της επιλογής μας στη συγκεκριμένη θέση αντί του *gfp*, τόσο ο φορέας όσο και η προς εισδοχή αλληλουχία πέπηκαν με τα παραπάνω περιοριστικά ένζυμα σύμφωνα με την αντίδραση:

Συστατικά μείγματος αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
Περιοριστικό ένζυμο <i>KpnI</i> (TAKARA)	2 μl (10 units/μl)
Περιοριστικό ένζυμο <i>NcoI</i> (TAKARA)	2 μl (10 units/μl)
10X K Buffer	0,5 X
DNA	2,5 mg
BSA 100 mM (bovine serum albumin)	0.01%
Type 1 H ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl

Επώαση στους 37 °C για 1 h.

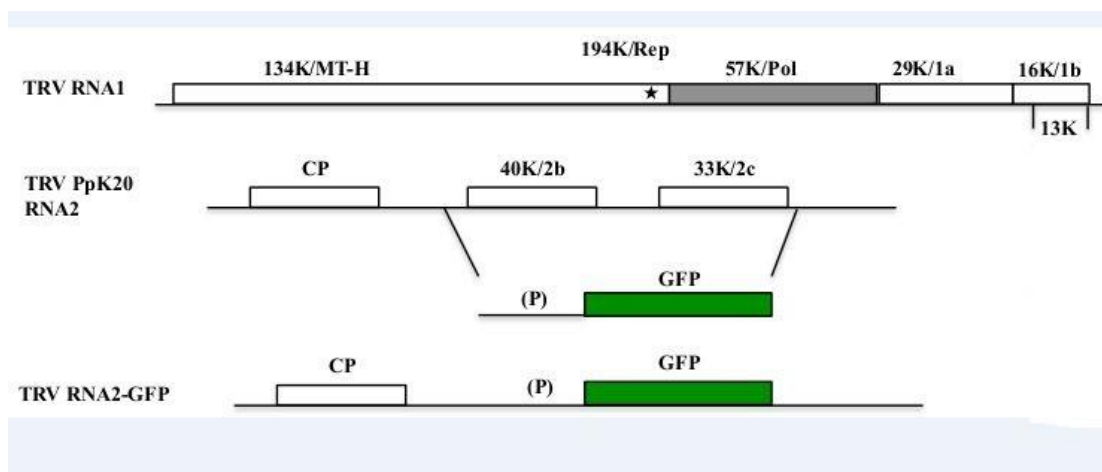
Για τη δημιουργία *in vitro* πλήρους μήκους ιικών RNA2 μεταγράφων TRV, η δημιουργία γραμμικού ιικού φορέα ήταν απαραίτητη. Για αυτόν τον λόγο, ο μετασχηματισμένος φορέας p0111, πέπηκε με το περιοριστικό ένζυμο *Sma*I.

Συστατικά μείγματος αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
Περιοριστικό ένζυμο <i>Sma</i> I (TAKARA)	5μl (10 units/μl)
10X T Buffer	1 X
DNA	5 μg
Διάλυμα BSA (bovine serum albumin)	0.01 %
Type 1 H ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl

Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 3 h.

2.17 Μεταγραφή *in vitro*

Το γονιδίωμα του TRV αποτελείται από ένα διμερές ss (+) RNA και αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο του γένους *Tobravirus* (οικογένεια *Virgaviridae*). Από αυτά, το RNA1, περιέχει τέσσερα πλαίσια ανάγνωσης, καθένα από τα οποία κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 194K, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών της μεθυλοτρανφεράσης, ελικάσης και της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης. Επίσης, το RNA1 κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες 29K και 16K, οι οποίες αποτελούν τη MP και τον καταστολέα RNA σίγησης του TRV. Το RNA 2, το οποίο στην παρούσα εργασία αποτελεί τον ιικό φορέα p0111 (αντικατάσταση των γονιδίων 2b και 2c με το γονίδιο της GFP και τον υποκινητή P), ποικίλει σε μέγεθος και σε γονίδια, αλλά κωδικοποιεί όχι μόνο την CP πρωτεΐνη του ιού, η οποία ενθυλακώνει τα δύο RNAs σε δύο διαφορετικά σωματίδια, αλλά και τις πρωτεΐνες 2b και 2c, οι οποίες συμμετέχουν στη μετάδοση του ιού μέσω των νηματωδών φορέων (**Εικόνα 2.2**).



Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση των TRVR NA1 και RNA2, καθώς και του ιϊκού φορέα p0111. Στην απεικόνιση παρουσιάζεται και ο υποκινητής P (υποκινητής του γονιδίου της ιϊκής πρωτεΐνη CP, στο υπογενωμικό RNA, των ιών του γένους *Tobravirus*).

Από τα παραπάνω προκύπτει η ανάγκη δημιουργίας πλήρους μήκους μολυσματικού RNA, από τον μετασχηματισμένο ιϊκό φορέα p0111, ώστε να επιτευχθεί μόλυνση των φυτικών οργανισμών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα MEGAscript® (Ambion®):

Συστατικά αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
Διάλυμα ATPs	7,5 mM
Διάλυμα CTPs	7,5 mM
Διάλυμα GTPs	7,5 mM
Διάλυμα UTPs	7,5 mM
10X T7 Reaction Buffer	1X
Μείγμα ενζύμου T7 RNA πολυμεράσης	2 µl
Γραμμικός ιϊκός φορέας	1µg
ddH ₂ O	για τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 3 h. Στη συνέχεια προστίθενται 27,5 αμμονίου (CH₃COONH₄) συγκέντρωσης 4,44 M, και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 min, φυγοκέντρωση στις 14000 rpm στους 4°C για 8 min, απομάκρυνση του υπερκλειμένου και ξέπλυμα με απόλυτη παγωμένη αιθανόλης 70% όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως στην κατακρήμνιση νουκλεοξέων με αιθανόλη. Η επαναδιάλυση του

ιζήματος γίνεται σε 40 µl RNase free H₂O, ακολουθεί μέτρηση της συγκέντρωσης σε σπεκτροφωτόμετρο, εκτίμηση της ακεραιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης και φύλαξη στους -30°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

2.18 Διαδικασία μετασχηματισμού ιϊκού φορέα

Για τον μετασχηματισμό του TRV-PrK20 (κλώνος P0111, που έφερε GFP) με τις ακολουθίες ή τα γονίδια επιλογής ακολουθήθηκε συνοπτικά η παρακάτω διαδικασία:

- Το P0111 πέπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI* και *KpnI* για να απομακρυνθεί το γονίδιο της GFP και να αντικατασταθεί με τις αλληλουχίες/γονίδια της επιλογής μας
- Ενισχύθηκε η επιθυμητή αλληλουχία του DNA εισδοχής μέσω αντίδρασης PCR με εκκινητές που έφεραν στα άκρα τους ένα από τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI* και *KpnI*
- Πραγματοποιήθηκε πέψη του εκάστοτε προϊόντος PCR και του φορέα με τα περιοριστικά ένζυμα, καθαρισμός του DNA χρησιμοποιώντας μεθόδους καθαρισμού του DNA ή απομόνωσης του τελευταίου από πήγμα αγαρόζης και κατευθυνόμενος μετασχηματισμός του ιϊκού φορέα με αντίδραση λιγάσης (Εικόνα 2.3).
- Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* με ηλεκτροδιάτρηση
- Επιλογή κλώνων
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA
- Επιβεβαίωση της εισδοχής και της ακεραιότητας του ανασυνδυασμένου ιού με αλληλούχιση νουκλεοτιδίων
- Παρασκευή μολυσματικών ικών RNA με *in vitro* μεταγραφή, προσδιορισμός της συγκέντρωσης τους σε σπεκτροφωτόμετρο, έλεγχος της ακεραιότητάς τους σε πήγμα αγαρόζης και ανάμειξη με ολικό RNA φυτού που περιέχει TRV-RNA1 (NM μόλυνση)

Μολύνσεις σε φυτά για αναπαραγωγή του ανασυνδυασμένου ιού

Κεφάλαιο 3.

Αποτελέσματα

3.1 Αναγνώριση της ορθολόγης PCaP1 πρωτεΐνης στη πιπεριά

Για τη διερεύνηση του ρόλου της PCaP1 (χαρακτηρισμένη σε *A. thaliana*) στο παθοσύστημα PVY-πιπεριά, πραγματοποιήθηκε η αναγνώριση της ορθολόγής της στον συγκριμένο ξενιστή με τη χρήση του βιοπληροφορικού εργαλείου nBLAST (<http://peppersequence.genomics.cn/page/species/blast.jsp>) και τη βάση δεδομένων του γονιδιώματος της πιπεριάς (The Pepper Genome Database, release 2.0). Από την ανάλυση στην οποία χρησιμοποιήθηκε η υπάρχουσα αλληλουχία του γονιδίου *pcap1* του φυτού *Arabidopsis thaliana* (At4g20260) προέκυψε το γονίδιο *C. annuum*L_Zunla-1, που βρίσκεται στη περιοχή 43929259, του χρωμοσώματος 10, έχει μέγεθος 678 bp, ενώ η αλληλουχία του είναι:

```
ATGGGATACTGGAAAGCAAAAGTTCTTCCAAAGATCAAGATGATCTTCGA  
GAAAAATGGACCCAAGAAGGCTGCTGCTGCTGAGGCATCCAAGACTTTTG  
ATGAAACTAAGGAGCAGTACAACAAGGAGTTCTGAAGAAAAGAAGGCTGA
```

GCTTCAACCCAAAGTAGTTGAAATTTATGAAGCTGCTGCAGTTGAGATCA
AGACTTTAGTGAAGGAACCAAAGGATGCAGGACTTAAGAAACACTCAGC
TGGAGTCCAAAAATTCCTTGATGAGCTTGTCAAAATCGAATTTCCGGGAT
CGAAAGCAGTAAGTGAAGCAAGCTCAAACCTTTGGGCCTTCATATGTATCC
GGCCCAATTCGCTTTGTGTTGAGAAAGTATCAACATTTATAGTCATCCCA
GAAGAAGAGAAGAAGAAAGAAGAGGAACCAGCACCTGTTGACGTGGCAC
CTGCTGATGTGGAAGCAACAACCTGCCACATCAGCTGAAGAGGTGGAGGTG
AAGGAGAAGGACATAGTTGTTGAAGCAGCAGAATCAAAGAAAGAAGAGG
AATCAGCACCTGCTGATGTGGCACCCGTTAAGGTGGAAGAAGTACCTGCA
CCTGCTGATGTGGCACCTGTCAAGGTGGAAGCAGCACCAGCAGCTGCAGC
TGCAGCAGCACCAGCACCATCAAAGGCTTAG

Από την μετάφραση του mRNA (678 bp), προκύπτει η ορθόλογη πρωτεΐνη της PCaP1(http://peppersequence.genomics.cn/page/species/genedetail.jsp?id=29435&dbKey=pepper_zunla), μεγέθους 225 αμινοξέων και αλληλουχίας:

MGYWKAKVLPKIKMIFEKNGPKKAAAAEASKTFDETKEQYNKEFEKKKAEL
QPKVVEIYEAAAVEIKTLVKEPKDAGLKKHSAGVQKFLDELVKIEFPGSKAVS
EASSNFGPSYVSGPIRFVFEKVSTFIVIPEEEKKKEEEPAPVDVAPADVEATTAT
SAEEVEVKEKDIVVEAAESKKEEESAPADVAPVKVEEVPAPADVAPVKVEAA
PAAAAAAPAPSKA

3.2 Διερεύνηση διαφορών στην αμινοξική αλληλουχία της PCaP1 σε ποικιλίες πιπεριάς με διαφορετική ευπάθεια σε απομονώσεις του PVY

Μία από τις προϋποθέσεις για την προσαρμογή ενός ιού σε έναν νέο φυτό-ξενιστή, είναι η αλλαγή του γενετικού υπόβαθρου του τελευταίου προς όφελος του ιού. Για τη διερεύνηση του κατά πόσο η πρωτεΐνη PCaP1 συμμετέχει στην προσαρμογή του PVY στη πιπεριά, στις ποικιλίες Yolo Wonder, Doux des Landes και Phyo636 οι οποίες έχουν διαφορετική ευπάθεια στον PVY (Moury, αδημοσίευτα αποτελέσματα) έγιναν δοκιμές μηχανικής μόλυνσης με την απομόνωση PVY-N605 της ομάδας N του ιού. Στις 19 ημέρες μετά τη μόλυνση (days post infection, dpi), πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία φυλλικού ιστού τόσο τοπικά όσο και διασυστηματικά. Ο έλεγχος των ιικών μολύνσεων έγινε με τη μέθοδο DAS-ELISA.

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα ιϊκών μολύνσεων της απομόνωσης PVY-N605, σε 3 ποικιλίες *C. annuum*

Ποικιλίες <i>C. annuum</i>	Μολυσμένα (Τοπικά)	Μολυσμένα (Διασυστημικά)
Yolo Wonder	3/10	0/3
Doux des Landes	7/10	1/7
Phyo636	0/10	0

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι και στη περίπτωση της PVY-N605 υπάρχει διαφορετική ευπάθεια και συγκεκριμένα, η ποικιλία Doux des Landes ήταν ευπαθής στη μόλυνση από την απομόνωση N605 τοπικά, με δυνατότητα διασυστημικής μετακίνησης του ιού, ενώ οι ποικιλίες Yolo Wonder και Phyo636 ήταν ανθεκτικές.

Στη συνέχεια ενισχύθηκαν με PCR τα γονίδια *PCaP1* των παραπάνω ποικιλιών, με σκοπό την αλληλούχιση τους και τη διερεύνηση για πιθανές σημειακές διαφορές. Οι αλληλουχίες των τριών γονιδίων στοιχήθηκαν χρησιμοποιώντας το <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, ενώ οι αμινοξικές αλληλουχίες των πιθανών πρωτεϊνικών προϊόντων προέκυψαν από το πρόγραμμα <http://web.expasy.org/translate/>, και στοιχήθηκαν με το <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, όπως παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 3.1).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
C. annumL_Zunla-1	ATGGGATACTGGAAGCAAAAGTTCTTCARAGATCAGATGATCTTCGAGAAARATGGACCCAGAGAGGCTGCTGCTGCTGAGGCATCCAGACCTTTTGATGAARACTAAGGGAGCAGTACACACAGGAGT														
Phyo636	ATGGGATACTGGAAGCAAAAGTTCTTCARAGATCAGATGATCTTCGAGAAARATGGACCCAGAGAGGCTGCTGCTGCTGAGGCATCCAGACCTTTTGATGAARACTAAGGGAGCAGTACACACAGGAGT														
YM	ATGGGATACTGGAAGCAAAAGTTCTTCARAGATCAGATGATCTTCGAGAAARATGGACCCAGAGAGGCTGCTGCTGCTGAGGCATCCAGACCTTTTGATGAARACTAAGGGAGCAGTACACACAGGAGT														
DDL	ATGGGATACTGGAAGCAAAAGTTCTTCARAGATCAGATGATCTTCGAGAAARATGGACCCAGAGAGGCTGCTGCTGCTGAGGCATCCAGACCTTTTGATGAARACTAAGGGAGCAGTACACACAGGAGT														
Consensus	ATGGGATACTGGAAGCAAAAGTTCTTCARAGATCAGATGATCTTCGAGAAARATGGACCCAGAGAGGCTGCTGCTGCTGAGGCATCCAGACCTTTTGATGAARACTAAGGGAGCAGTACACACAGGAGT														
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
C. annumL_Zunla-1	TCGAGGAAGAGAGGCTGAGCTTCARCCCAAGTAGTTGAARATTTATGAGCTGCTGCAGTTTGAGATCAGAGACTTTAGTGAAGGAACCAAGAGGATGCAGGACTTAGAARACACTCAGCTGGAGTCCAAA														
Phyo636	TCGAGGAAGAGAGGCTGAGCTTCARCCCAAGTAGTTGAARATTTATGAGCTGCTGCAGTTTGAGATCAGAGACTTTAGTGAAGGAACCAAGAGGATGCAGGACTTAGAARACACTCAGCTGGAGTCCAAA														
YM	TCGAGGAAGAGAGGCTGAGCTTCARCCCAAGTAGTTGAARATTTATGAGCTGCTGCAGTTTGAGATCAGAGACTTTAGTGAAGGAACCAAGAGGATGCAGGACTTAGAARACACTCAGCTGGAGTCCAAA														
DDL	TCGAGGAAGAGAGGCTGAGCTTCARCCCAAGTAGTTGAARATTTATGAGCTGCTGCAGTTTGAGATCAGAGACTTTAGTGAAGGAACCAAGAGGATGCAGGACTTAGAARACACTCAGCTGGAGTCCAAA														
Consensus	TCGAGGAAGAGAGGCTGAGCTTCARCCCAAGTAGTTGAARATTTATGAGCTGCTGCAGTTTGAGATCAGAGACTTTAGTGAAGGAACCAAGAGGATGCAGGACTTAGAARACACTCAGCTGGAGTCCAAA														
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
C. annumL_Zunla-1	ATTCCTTGATGAGCTTGTCARAAATCGAATTTCCGGGATCGAAGCAGTAGTGAGCAGCTCAACCTTTGGGCCCTCATATGTATCCGGCCCAATTCGCTTTGTGTTTCGAGAAGTATCACATTTTATA														
Phyo636	ATTCCTTGATGAGCTTGTCARAAATCGAATTTCCGGGATCGAAGCAGTAGTGAGCAGCTCAACCTTTGGGCCCTCATATGTATCCGGCCCAATTCGCTTTGTGTTTCGAGAAGTATCACATTTTATA														
YM	ATTCCTTGATGAGCTTGTCARAAATCGAATTTCCGGGATCGAAGCAGTAGTGAGCAGCTCAACCTTTGGGCCCTCATATGTATCCGGCCCAATTCGCTTTGTGTTTCGAGAAGTATCACATTTTATA														
DDL	ATTCCTTGATGAGCTTGTCARAAATCGAATTTCCGGGATCGAAGCAGTAGTGAGCAGCTCAACCTTTGGGCCCTCATATGTATCCGGCCCAATTCGCTTTGTGTTTCGAGAAGTATCACATTTTATA														
Consensus	ATTCCTTGATGAGCTTGTCARAAATCGAATTTCCGGGATCGAAGCAGTAGTGAGCAGCTCAACCTTTGGGCCCTCATATGTATCCGGCCCAATTCGCTTTGTGTTTCGAGAAGTATCACATTTTATA														
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	
C. annumL_Zunla-1	GTATCCCGAGAGAGGAGAGAGAGAGAGAGGAGGACCCAGCAGCTTGTGACGTGGCACCCTGCTGATGTGGAGCAGACACTGCCACATCAGCTGAAGAGGTTGAGGTTGAGGAGAGAGGACATAGTTGTTG														
Phyo636	GTATCCCGAGAGAGGAGAGAGAGAGAGAGGAGGACCCAGCAGCTTGTGACGTGGCACCCTGCTGATGTGGAGCAGACACTGCCACATCAGCTGAAGAGGTTGAGGTTGAGGAGAGAGGACATAGTTGTTG														
YM	GTATCCCGAGAGAGGAGAGAGAGAGAGAGGAGGACCCAGCAGCTTGTGACGTGGCACCCTGCTGATGTGGAGCAGACACTGCCACATCAGCTGAAGAGGTTGAGGTTGAGGAGAGAGGACATAGTTGTTG														
DDL	GTATCCCGAGAGAGGAGAGAGAGAGAGAGGAGGACCCAGCAGCTTGTGACGTGGCACCCTGCTGATGTGGAGCAGACACTGCCACATCAGCTGAAGAGGTTGAGGTTGAGGAGAGAGGACATAGTTGTTG														
Consensus	GTATCCCGAGAGAGGAGAGAGAGAGAGAGGAGGACCCAGCAGCTTGTGACGTGGCACCCTGCTGATGTGGAGCAGACACTGCCACATCAGCTGAAGAGGTTGAGGTTGAGGAGAGAGGACATAGTTGTTG														
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	
C. annumL_Zunla-1	AAGCAGCAGGATCAGAAGAGAGAGGAGATCAGCAGCTGCTGATGTGGCACCCTGTAGGTGGAGAGAGTACCTGCACCTGCTGATGTGACCTGTCAGGTTGAGGAGCAGCAGCCAGCAGCTGCAGCTGC														
Phyo636	AAGCAGCAGGATCAGAAGAGAGAGGAGATCAGCAGCTGCTGATGTGGCACCCTGTAGGTGGAGAGAGTACCTGCACCTGCTGATGTGACCTGTCAGGTTGAGGAGCAGCAGCCAGCAGCTGCAGCTGC														
YM	AAGCAGCAGGATCAGAAGAGAGAGGAGATCAGCAGCTGCTGATGTGGCACCCTGTAGGTGGAGAGAGTACCTGCACCTGCTGATGTGACCTGTCAGGTTGAGGAGCAGCAGCCAGCAGCTGCAGCTGC														
DDL	AAGCAGCAGGATCAGAAGAGAGAGGAGATCAGCAGCTGCTGATGTGGCACCCTGTAGGTGGAGAGAGTACCTGCACCTGCTGATGTGACCTGTCAGGTTGAGGAGCAGCAGCCAGCAGCTGCAGCTGC														
Consensus	AAGCAGCAGGATCAGAAGAGAGAGGAGATCAGCAGCTGCTGATGTGGCACCCTGTAGGTGGAGAGAGTACCTGCACCTGCTGATGTGACCTGTCAGGTTGAGGAGCAGCAGCCAGCAGCTGCAGCTGC														
	651	660	670	678											
C. annumL_Zunla-1	AGCAGCAGCAGCAGCATTCAAGGCTTAG														
Phyo636	AGCAGCAGCAGCAGCATTCAAGGCTTAG														
YM	AGCAGCAGCAGCAGCATTCAAGGCTTAG														
DDL	AGCAGCAGCAGCAGCATTCAAGGCTTAG														
Consensus	AGCAGCAGCAGCAGCATTCAAGGCTTAG														

Εικόνα 3.1 Στοιχισή γονιδιακής και πρωτεϊνικής αλληλουχίας , του γονιδίου *PCaP1* και της πρωτεΐνης PCaP1, των ποικιλιών Phyto636, Yolo Wonder και Doux des Landes του *C. annuum*.

ποικιλίας Doux des Landes, σε σχέση με τις ποικιλίες Phyto636 και Yolo Wonder. Η πρώτη διαφοροποίηση βρίσκεται στη θέση 97, όπου το ουδέτερο φορτισμένο αμινοξύ φαινυλαλανίνη αντικαθίσταται από το ουδέτερο φορτισμένο αμινοξύ λευκίνη, ενώ η δεύτερη και σημαντικότερη διαφοροποίηση βρίσκεται στη θέση 204, όπου στη θέση του ουδέτερο φορτισμένου αμινοξέος αλανίνη βρίσκεται το αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ θρεονίνη.

3.3 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών μέσω του φορέα TRV-PpK20

Στην παρούσα εργασία ο φορέας TRV-PpK20 μετασχηματίστηκε με τα ακόλουθα τμήματα DNA:

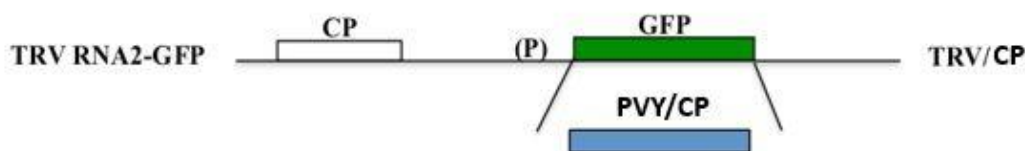
α) το γονίδιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκφραση της καψιδιακής πρωτεΐνης (CP) του PVY

β) μέρος της αλληλουχίας του *PCaP1* της *C. annuum* cv. Yolo Wonder, όπως προέκυψε μετά από την αναγνώριση, ενίσχυση και αλληλούχισή της. Η περιοχή εισδοχής των παραπάνω δημιουργήθηκε μετά την απομάκρυνση του γονιδίου της GFP, μέσω επεξεργασίας με περιοριστικά ένζυμα

3.3.1 Έκφραση της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVY-SON41

Σαν θετικός μάρτυρας για την λειτουργία του βασισμένου στον TRV-PpK20 ετερόλογου συστήματος έκφρασης πρωτεϊνών επιλέχθηκε το γονίδιο καψιδιακής πρωτεΐνης (CP) της απομόνωσης PVY-SON41 η ανίχνευση της οποίας είναι δυνατή μέσω των εμπορικών αντιδραστηρίων ELISA που είναι διαθέσιμα για τον PVY. Βάσει της αλληλουχίας του PVY-SON41 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ439544>) σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές, στους οποίους συμπεριλαμβάνονταν περιοχές αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NcoI* και *KpnI* (3' και 5' άκρο αντίστοιχα) για την ενίσχυση της CP γονιδιοματικής περιοχής με PCR. Το γονίδιο της CP αφού ενισχύθηκε,

κλωνοποιήθηκε στον φορέα pCR®II-TOPO® και επιβεβαιώθηκε η ακεραιότητά του μέσω αλληλούχισης νουκλεοτιδίων (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 Σχηματική απεικόνιση αντικατάστασης του γονιδίου της GFP, με το γονίδιο της ιϊκή πρωτεΐνης της απομόνωσης SON41 του ιού PVY, στον ιϊκό φορέα TRV-PpK20.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης για την εισαγωγή του γονιδίου της CP στον ιϊκό φορέα TRV-PpK20, κλωνοποιήθηκε σε *E.coli* DH5a, και τελικά παράχθηκε μολυσματικό RNA του ιού με *in vitro* μεταγραφή (Εικόνα 4 Α,Β,Γ). Στη συνέχεια μολύνθηκαν φυτά του είδους *N. benthamiana* και ύστερα από επτά ημέρες ανιχνεύτηκε σε αυτά η έκφραση της ιϊκής CP με DAS-ELISA με αντισώματα εξειδικευμένα ως προς τον PVY (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2 Ανίχνευση έκφρασης της πρωτεΐνης PVY-CP μέσω του ιϊκού φορέα TRV-PpK20 με τη μέθοδο DAS-ELISA.

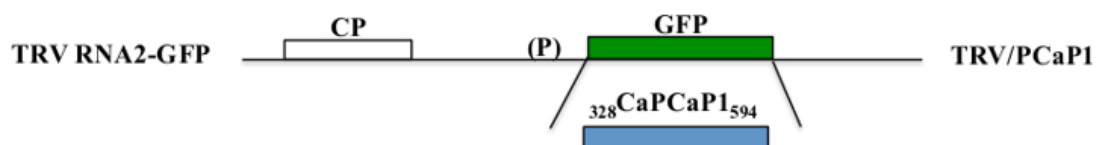
Δείγμα	Οπτική απορρόφηση
Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (blanc)	0
NC (Αρνητικός μάρτυρας)	0,059
PC (θετικός μάρτυρας)	2,816
NB (<i>N. benthamiana</i>)/TRV-PpK20/PVY-CP	1,045

Συνεπώς, η διαδικασία εισαγωγής της CP της απομόνωσης PVY-SON41 στον TRV-PpK20 ήταν επιτυχής και μπορεί να επαναληφθεί αντίστοιχα για την μεταγραφή της αλληλουχίας επιλογής της παρούσης εργασίας.

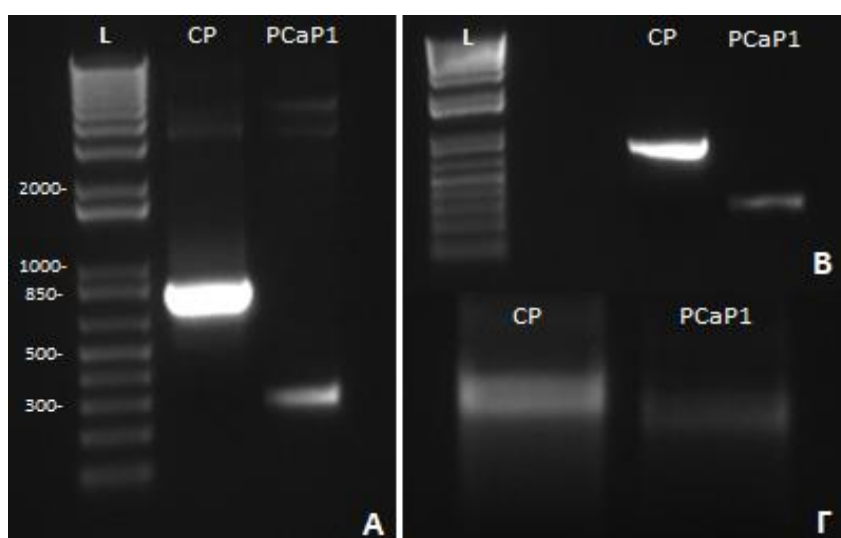
3.3.2 Δημιουργία VIGS κατασκευής για τη PCaP1

Ακολουθώντας τη παραπάνω διαδικασία (Εικόνα 4 Α,Β,Γ), δημιουργήθηκε ο μετασχηματισμένος TRV-PCaP1/VIGS φορέας που έφερε το τμήμα της παρακάτω αλληλουχίας του γονιδίου (**Εικόνα 3.3**):

(³²⁸)TTCCTTGATGAGCTTGTCAAAATCGAATTTCCGGGATCGAAAGCAGTA
AGTGAAGCGCTCAAACCTTTGGGCCTTCATATGTATCCGGCCCAATTCGCTT
TGTGTTTCGAGAAAGTATCACATTTATAGTCATCCCAGAAGAAGAGAAGAA
GAAAGAAGAGGAACCAGCACCTGTTGACGTGGCACCTGCTGATGTGGAA
GCAACAACCTGCCACATCAGCTGAAGAGGTGGAGGTGAAGGAGAAAGACA
TAGTTGTTGAAGCAGCA(⁵⁹⁴)



Εικόνα 3.3 Σχηματική απεικόνιση αντικατάστασης του γονιδίου της GFP, με το γονίδιο της πρωτεΐνης PCaP1 του είδους *C. annuum* cv. Yolo Wonder στον φορέα TRV-PCaP1/VIGS.

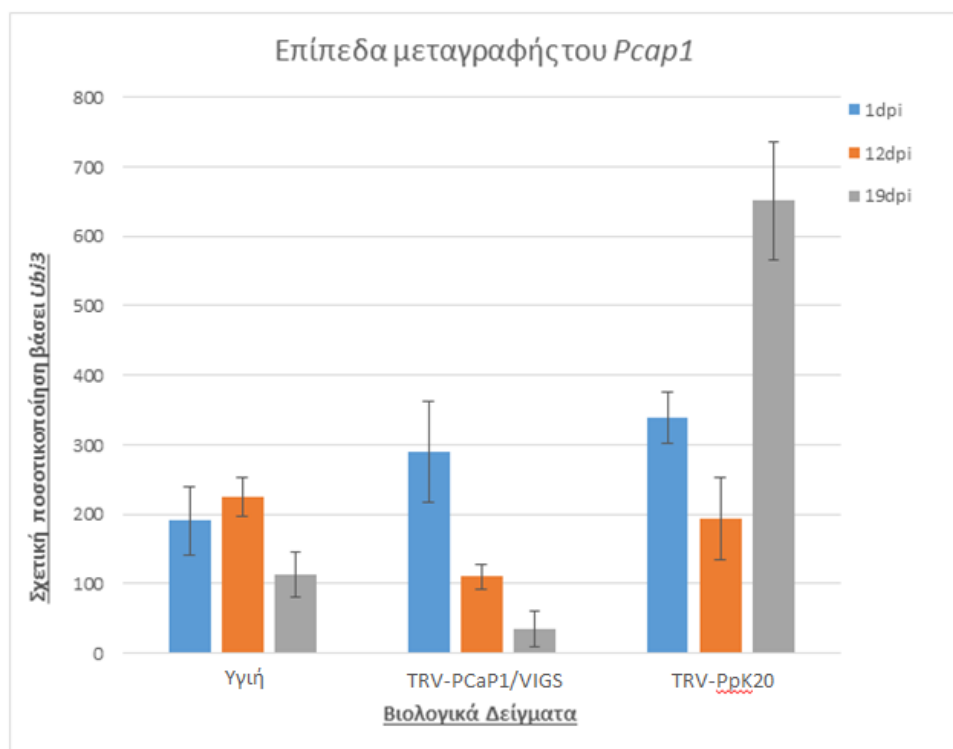


Εικόνα 3.4 Απεικόνιση πύργου αгарόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση των PVY-CP (814 bp) και τμήματος ³²⁸CaPCaP1₅₉₄ (264 bp) στα τρία βήματα παραγωγής

μολυσματικού RNA των από τους μετασχηματισμένους ιϊκούς φορείς TRV-PpK20/PVY-CP (Παράγραφος 3.3.1) και TRV-PCaP1/VIGS. Α) Ενίσχυση της PVY-CP και του $^{328}\text{CaPCaP1}_{594}$ μέσω αντίδρασης PCR, Β) καθαρισμός των προϊόντων των παραπάνω των αντιδράσεων PCR, με σκοπό της εισαγωγή τους, μέσω αντίδρασης λιγάσης στον ιικό φορέα TRV-PpK20, και Γ) παραγωγή μολυσματικού RNA από τους μετασχηματισμένους ιϊκούς φορείς μέσω αντιδράσεων *in vitro* μεταγραφής. (L) Κλίμακα μοριακών βαρών DNA (1 Kb Plus ladder, INVITROGENTM), (CP) PVY-CP, και (PCaP1) $^{328}\text{CaPCaP1}_{594}$. Για τις παραπάνω απεικονίσεις χρησιμοποιήθηκε το 10% των προϊόντων των εκάστοτε αντιδράσεων.

Ακολούθησε πείραμα για τη δοκιμή της αποτελεσματικότητας της σίγησης μέσω του TRV-PCaP1/VIGS με τρεις επεμβάσεις: α) 30 *C. annuum* cv. Yolo Wonder μολύνθηκαν με TRV-PCaP1/VIGS, β) 30 *C. annuum* cv. Yolo Wonder μολύνθηκαν με TRV-PpK20 και γ) οκτώ *C. annuum* cv. Yolo Wonder παρέμειναν αμόλυντα σαν μάρτυρες. Στα χρονικά διαστήματα 1 dpi, 12 dpi και 19 dpi πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από κορυφαία τμήματα των φυτών όπου δεν είχε πραγματοποιηθεί η μόλυνση (διασυστηματική δειγματοληψία), ενώ παρουσίαζαν συμπτώματα μόλυνσης τοπικά. Συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις των 1 και 12 dpi έγινε δειγματοληψία από 4 φυτά τις εκάστοτε κατηγορίας, ενώ στην περίπτωση των 19 dpi έγινε δειγματοληψία στο σύνολο των φυτών κάθε κατηγορίας, τα οποία παρουσίαζαν συμπτώματα μόλυνσης, πιο αναλυτικά, από την (α) επέμβαση έγινε δειγματοληψία από 14 φυτά, από την (β) επέμβαση από 5 φυτά, και από την (γ) επέμβαση από 8 φυτά. Η σχετική ποσοτικοποίηση του ως προς μελέτη γονιδίου προέκυψε από τον τύπο $\Delta\text{Ct}=2^{-(\text{Ct}_{\text{γονιδίου μελέτης}} - \text{Ct}_{\text{γονιδίου αναφοράς}})}$ για κάθε φυτό, ενώ τα αποτελέσματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την κατηγορία μολύνσεων στην οποία άνηκε το κάθε φυτό. Στη συνέχεια εξετάστηκε με RT-qPCR η ποσότητα των μεταγράφων του *PCaP1* με στόχο το προσδιορισμό του χρονικού σημείου που επιτεύχθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό σίγησης μέσω του TRV-PCaP1/VIGS σε σχέση με ένα αμόλυντο φυτό της ίδιας ηλικίας. Παράλληλα εξετάστηκε πιθανή επίδραση του ίδιου του TRV στο επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου. Από την ανάλυση προέκυψε ότι κατά τη 12^η μέρα μετά τη μόλυνση με TRV-PCaP1/VIGS το επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου *PCaP1* είχε μειωθεί στο 38% σε σχέση με ένα φυσιολογικό υγιές φυτό ενώ επτά ημέρες αργότερα (19 dpi) στο 12%. Επιπλέον, η μόλυνση με TRV-PpK20 είχε

σαν αποτέλεσμα ίδια ή και αυξημένα επίπεδα μεταγραφής σε σχέση με τον μάρτυρα (υγιής πιπεριά) και συνεπώς η μείωση του επιπέδου μεταγραφής του *PCaP1* μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά σε φαινόμενο VIGS και όχι σαν αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης με τον ίδιο τον ιικό φορέα (TRV). Συνεπώς το χρονικό διάστημα των 12 ημερών κρίθηκε ικανό για την εμφάνιση της δράσης VIGS για το *PCaP1* μέσω του TRV-PCaP1/VIGS και με βάση αυτό σχεδιάστηκαν οι επόμενες δοκιμές (Εικόνα 3.5).

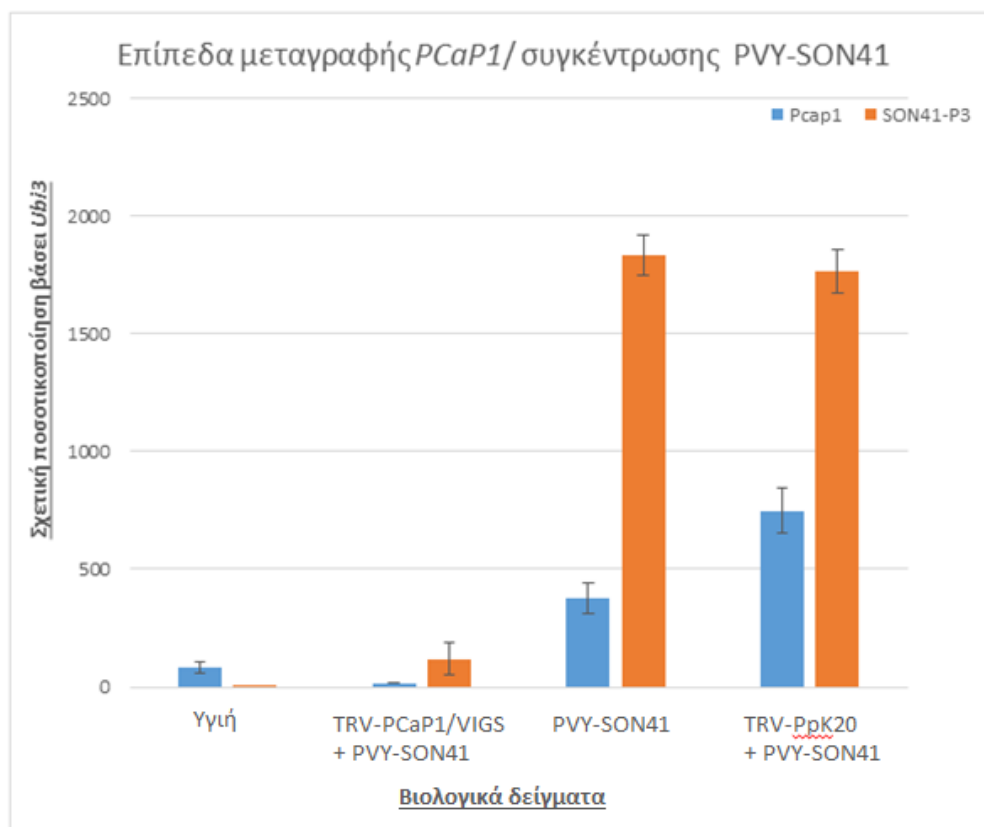


Εικόνα 3.5 Ποσοτικοποίηση του επιπέδου μεταγραφής του *PCaP1* σε *C. annuum* cv. Yolo Wonder, 1, 12 και 19 ημέρες μετά τη μόλυνση με TRV-PCaP1/VIGS, TRV-PpK20 καθώς και σε αμόλυντα (υγιή) φυτά.

3.3.3 Διερεύνηση της επίδρασης της σίγησης του γονιδίου PCaP1 στη μετακίνηση της απομόνωσης PVY-SON41

3.3.3.1 Επίδραση σε διασυστηματικό επίπεδο

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της σίγησης του γονιδίου της πρωτεΐνης PCaP1 μέσω VIGS στη μετακίνηση της απομόνωσης PVY-SON41, στο φυτό-ξενιστή *C. annuum* cv. Yolo Wonder χρησιμοποιήθηκαν τρεις κατηγορίες φυτών: α) υγιή (5 φυτά), β) μολυσμένα με TRV-PCaP1/VIGS (5 φυτά) και γ) μολυσμένα με TRV-PpK20 (5 φυτά). Δώδεκα ημέρες αργότερα, πραγματοποιήθηκαν οι μολύνσεις με την PVY-SON41 και στις τρεις σειρές των φυτών ενώ τρία (3) φυτά κρατήθηκαν υγιή ως μάρτυρες. Εννέα ημέρες αργότερα, (21 ημέρες από την αρχική μόλυνση) πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στα κορυφαία φύλλα όλων των φυτών και των τεσσάρων κατηγοριών. Η σχετική ποσοτικοποίηση των ως προς μελέτη γονιδίων προέκυψε από τον τύπο $\Delta Ct = 2^{-(Ct \text{ γονιδίου μελέτης} - Ct \text{ γονιδίου αναφοράς})}$ για κάθε φυτό, ενώ τα αποτελέσματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την κατηγορία μολύνσεων στην οποία άνηκαν τα τελευταία. Έπειτα, γινε εξαγωγή ολικού RNA και ακολούθησε RT-qPCR με στόχους α) τα μετάγραφα του *PCaP1* και β) τον ιό PVY-SON41 με εκκινητές σχεδιασμένους στη P3 γονιδιωματική περιοχή του. Η ανάλυση έδειξε ότι σε χρονική περίοδο 21 ημερών μετά τη μόλυνση με TRV-PCaP1/VIGS και εννέα μετά τη μόλυνση με PVY-SON41 τόσο το επίπεδο μεταγραφής του *PCaP1* όσο και η συγκέντρωση του PVY ήταν σημαντικά μειωμένα σε σχέση με φυτά που δεν είχαν υποστεί σίγηση όσο και με φυτά που είχαν μολυνθεί μόνο με PVY-SON41 ή διαδοχικά με TRV-PpK20 και PVY-SON41 (Εικόνα 3.6).

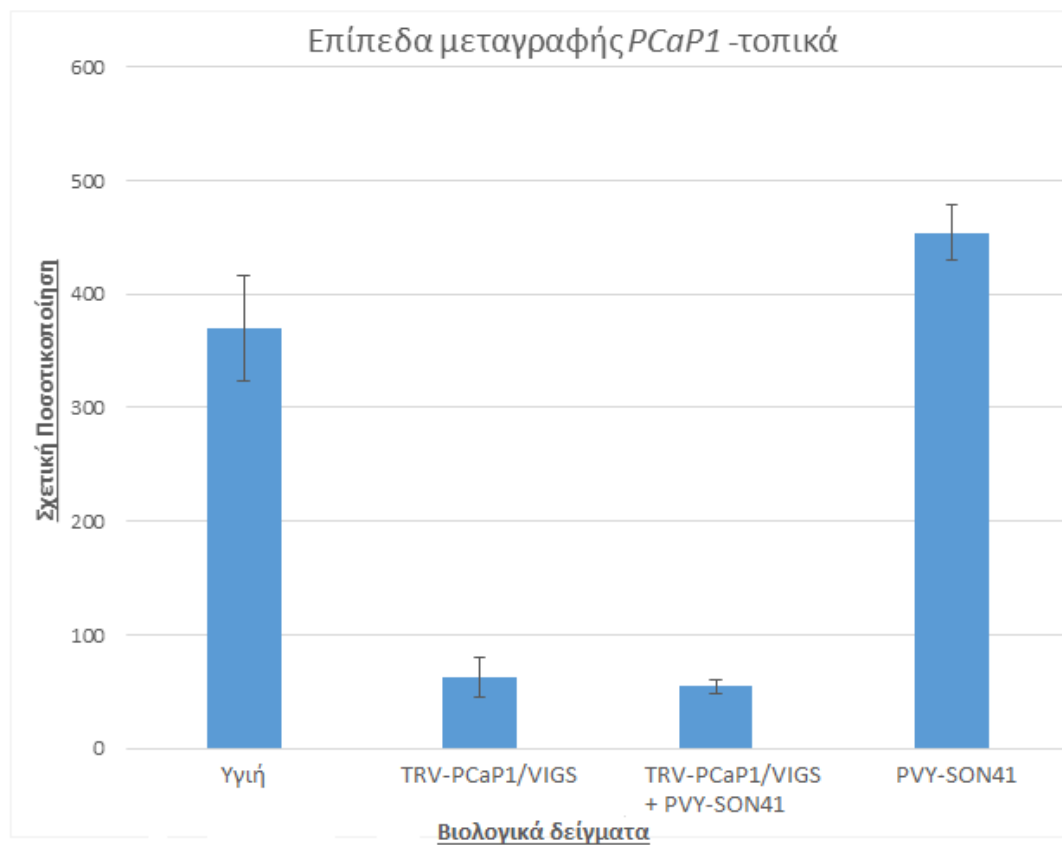


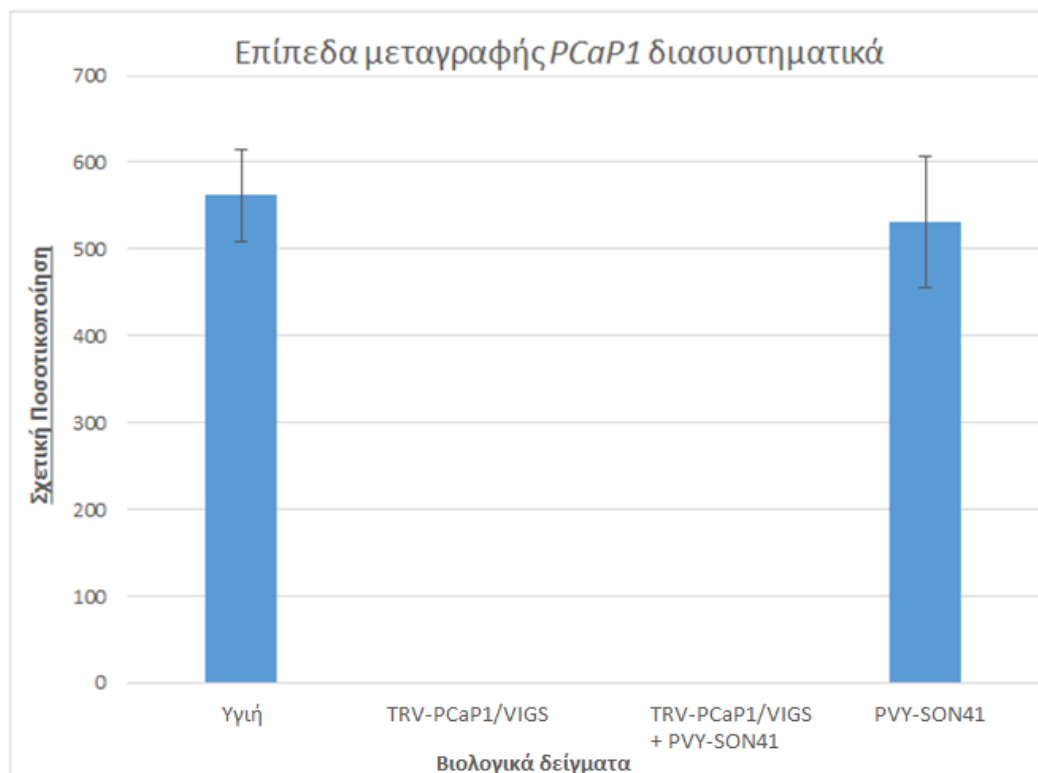
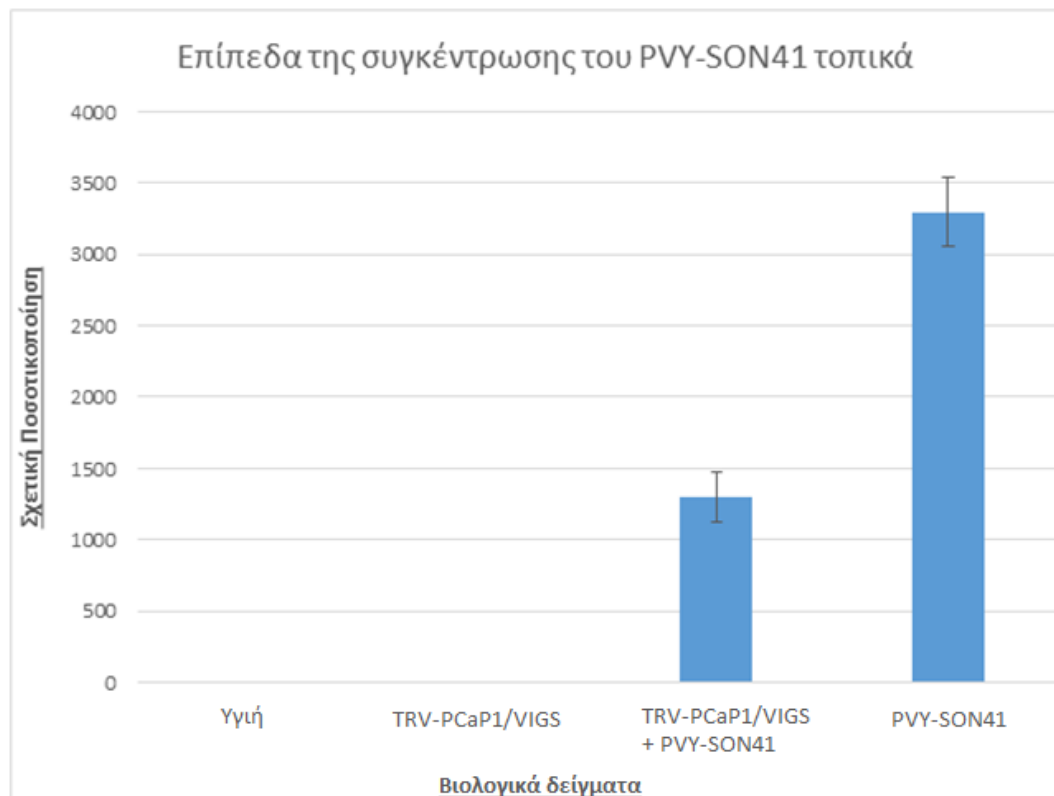
Εικόνα 3.6 Ποσοτικοποίηση του επιπέδου μεταγραφής του *PCaP1* και του επιπέδου συγκέντρωσης του PVY-SON41, σε *C. annuum* cv. Yolo Wonder σε τέσσερις επεμβάσεις: α) Υγιή, β) Μολυσμένα με TRV-PCaP1/VIGS και στη συνέχεια με PVY-SON41, γ) Μολυσμένα με PVY-SON41, και δ) Μολυσμένα με TRV-PpK20 και στη συνέχεια με PVY-SON41.

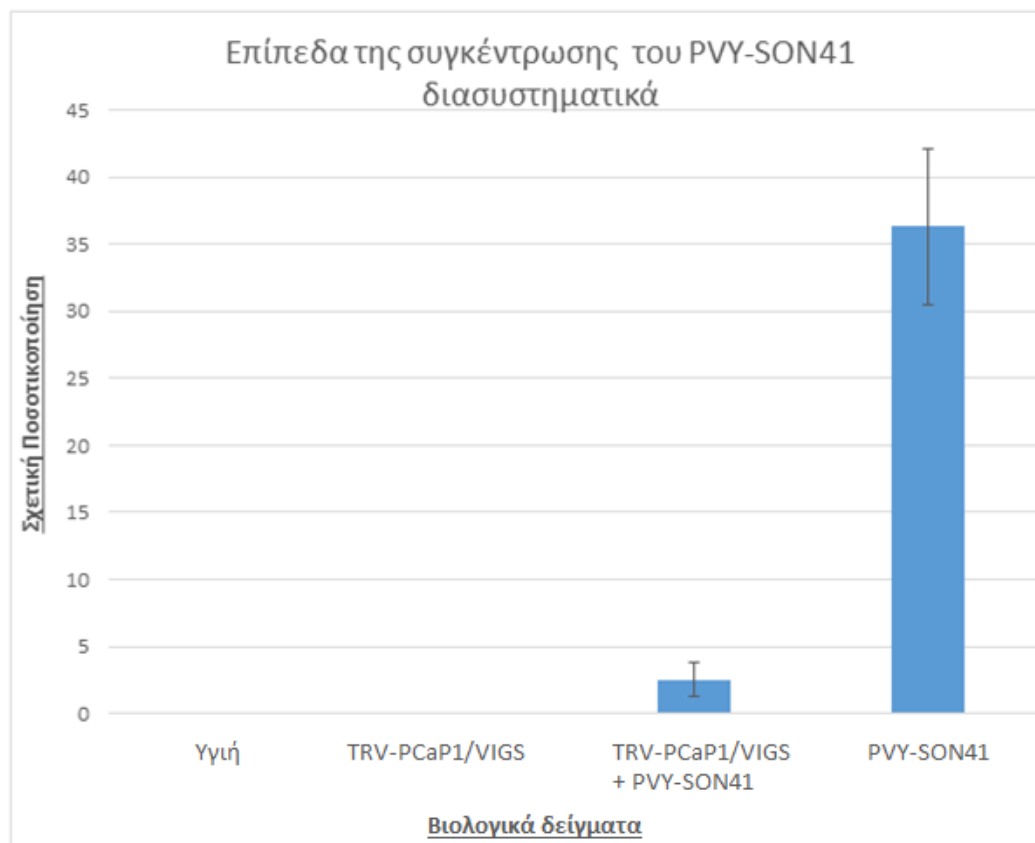
3.3.3.2 Μελέτη της επίδρασης σε διασυστηματικό επίπεδο και στα φύλλα που έγινε η μόλυνση (τοπικό επίπεδο)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο κατηγορίες φυτών: α) υγιή και β) μολυσμένα με TRV-PCaP1/VIGS. Δώδεκα ημέρες αργότερα, φυτά των ομάδων α) και β) μολύνθηκαν με PVY-SON41 με αποτέλεσμα τη δημιουργία τεσσάρων κατηγοριών : α) υγιή (6 φυτά), β) μολυσμένα με TRV-PCaP1/VIGS (5 φυτά), γ) μολυσμένα με TRV-PCaP1/VIGS και στη συνέχεια με PVY-SON41 (10 φυτά) και δ) μολυσμένα με την απομόνωση PVY-SON41 (6 φυτά). Επτά ημέρες αργότερα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στα μέρη όλων των φυτών όπου είχαν πραγματοποιηθεί οι μολύνσεις (τοπικά), ενώ 13 ημέρες αργότερα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στα κορυφαία φύλλα (διασυστηματικά). Η σχετική ποσοτικοποίηση των ως προς μελέτη γονιδίων

προέκυψε από τον τύπο $\Delta Ct = 2^{-(Ct \text{ γονιδίου μελέτης} - Ct \text{ γονιδίου αναφοράς})}$ για κάθε φυτό, ενώ τα αποτελέσματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την κατηγορία μολύνσεων στην οποία άνηκαν τα τελευταία.. Όπως προηγουμένως έγινε απομόνωση ολικού RNA και ακολούθησε RT-qPCR με στόχους α) τα μετάγραφα του *PCaP1* και β) τον ιό PVY-SON41 με εκκινητές σχεδιασμένους στη P3 γενοματική περιοχή του. Σε αντιστοιχία με το πρώτο πείραμα (παράγραφος 3.3.2) οι αναλύσεις κατέδειξαν ότι η σίγηση του μεταγραφικού επιπέδου του *PCaP1* έχει σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του PVY-SON41 τόσο τοπικά όσο και διασυστηματικά (Εικόνα 3.7 Α,Β,Γ,Δ).

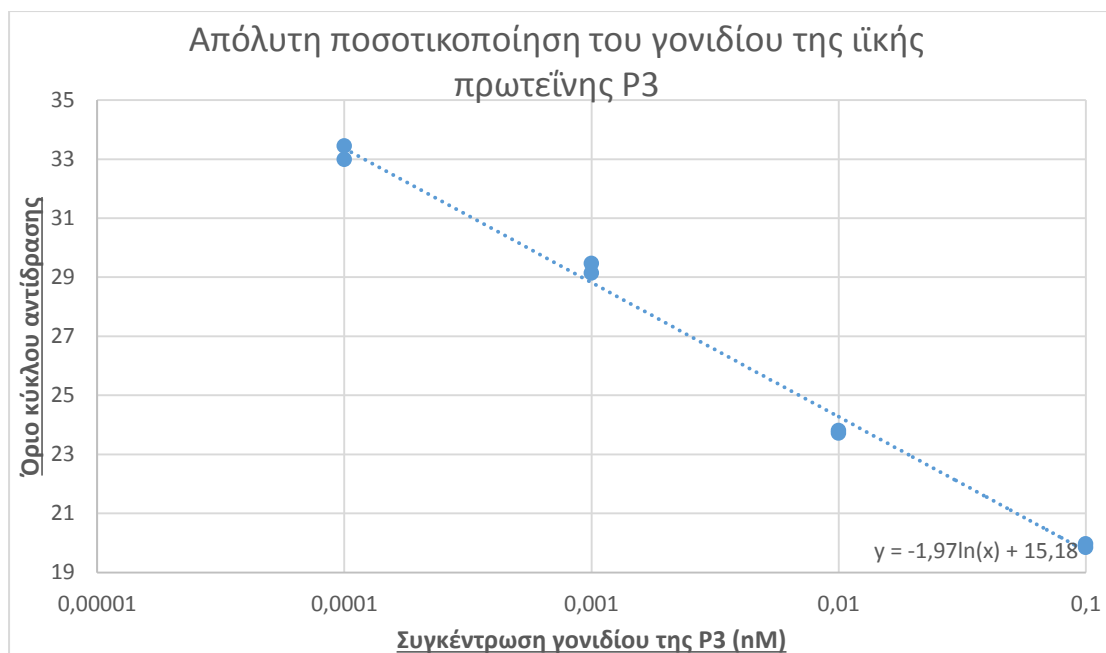






Εικόνα 3.7 Ποσοτικοποίηση του επιπέδου μεταγραφής του *PCaP1* και του επιπέδου συγκέντρωσης του PVY-SON41 τοπικά (Α) και διασυστηματικά (Β), σε *C. annuum* cv. Yolo Wonder μολυσμένα με TRV-PCaP1/VIGS, με TRV-PCaP1/VIGS και στη συνέχεια με PVY-SON41, μολυσμένα μόνο με PVY-SON41 καθώς και σε υγιή φυτά (αφορά μόνο μετάγραφα *PCaP1*).

Η ποσότητα του PVY-SON41 μεταξύ των εξεταζόμενων επεμβάσεων υπολογίστηκε και με RT-qPCR απόλυτης ποσοτικοποίησης, για τον υπολογισμό της ακριβούς συγκέντρωσης του γονιδίου της ιϊκής πρωτεΐνη P3, και κατά επέκταση του συνολικού ιϊκού γονιδιώματος. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις γνώστης συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA του RNA2 του ιικού φορέα TRV-PpK20 που έφερε τη περιοχή P3 του PVY-SON41 (κλώνος TRV_SON41P3) και ήταν διαθέσιμος στο Εργαστήριο Ιολογίας (συγκεντρώσεις 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} και 10^{-1} nM) ώστε να δημιουργηθεί μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς (**Εικόνα 3.8**).



Εικόνα 3.8 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων του γονιδίου της ιϊκής πρωτεΐνης P3 και των ορίων των κύκλων της αντίδρασης qPCR, κατά τους οποίους ανιχνεύονται.

Με βάση την εξίσωση που προέκυψε από την παραπάνω καμπύλη αναφοράς, υπολογιστήκανε η απόλυτη συγκέντρωση του γονιδίου της P3, στα φυτά που είχαν μολυνθεί με την απομόνωση PVY-SON41. Σε εκείνα όπου είχε πραγματοποιηθεί σίγηση του γονιδίου *PCaP1*, η συγκέντρωση του ιού υπολογίστηκε $3,2 \times 10^{-4}$ nM, ενώ στα φυτά που ήταν μολυσμένα με μόνο με PVY-SON41 υπολογίστηκε $3,1 \times 10^{-3}$ nM, PVY-SON41 επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα στα οποία η ανάλυση έγινε με σχετική ποσοτικοποίηση με το γονίδιο αναφοράς *Ubi3*.

3.4 Σημειακή μεταλλαγή στην αλληλουχία της P3 περιοχής του PVY-SON41 για τη δημιουργία της P3N-PIPO

Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 1.3, η ιϊκή πρωτεΐνη P3N-PIPO του ιού PVY, παράγεται ύστερα από τροποποίηση του πλαισίου ανάγνωσης της περιοχής του γονιδιώματος του τελευταίου, από την οποία παράγεται η πρωτεΐνη P3, μέσω μίας διαδικασίας ολίσθησης της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, η οποία σαν

αποτέλεσμα έχει την προσθήκη ενός μορίου αδενίνης στο συντηρημένο μοτίβο GA₆. Για τον λόγο αυτό, και για την δημιουργία μετασχηματισμένου ιϊκού φορέα, ο οποίος θα έχει την ικανότητα παραγωγής αποκλειστικά της πρωτεΐνης P3N-PIPO, με στόχο τη μελέτη πιθανής συμπληρωματικής *in trans* δράσης των ιϊκών πρωτεϊνών P3 και P3N-PIPO, μέσω αγροεμποτισμού με *Agrobacterium tumefaciens*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της OE-PCR, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.8. Παρακάτω παρουσιάζονται οι αλληλουχίες που προέκυψαν, των οποίων η ακεραιότητα επιβεβαιώθηκε μέσω αλληλούχισης νουκλεοτιδίων, στο εκάστοτε βήμα/αντίδρασης PCR, όπως επίσης και οι απεικονίσεις των προϊόντων, αφού πρωτίστως ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.9).

Αρχική αλληλουχία της P3 του ιού PVY
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ439544>):

GGTGTTCCTAATGCATGCCCTGAACTTGGGTCCACTAGATCACCTTTCAGA
GAAGGAGGATGCATAATGTCTGAGTCAGCAGCACTAAACTGCTTTTAAA
GGGAATTTTATAGACCTAAGGTGATGAGACAGTTGCTGTTGGATGAACCTT
ACCTGTTGATTCTATCAATATTATCTCCTGGCATTCTGATGGCTATGTATA
ATAATGGGATTTTGAACCTTGCAGGTGAGGTTGTGGATTAATGAGAAACAA
TCCATAGCCTTAATAGCATCGTTGCTGTCAGCTTTAGCTCTACGAGTGTCA
GCAGCAGAAACACTCATCGCACAGAGGATCATAATCGATGCTGCAGCCAC
AGATCTCCTTGATGCTACGTGTGATGGGTTC AACCTATATCTAACGTATCC
CACTGC ACTGATGGTGTGCAAGTTGTCAAGAATAGAAATGAGTGCGATG
ATACCTTATTTAAGGCGGGCTTTTCAAGTTACAGCACGAGTGTCTGACAG
ATTATG**GAAAAAA**TTATCTAGATCTCTTGGACGATGCTTGGAGAGATTT
AACTTGGCGAGAAAAATTGTCCGCAACATGGCATTTCATACAGAGCAAGAC
GCTATATCACTCGGTCTATAAAACCCACAGGAAAGGCAGATTTGAAAGGG
TTATACAACATATCACCACAAGCATTCTTGGGTCAAAGCGTTCAGAAGGT
CAAAAACACTACTTCAGGTTTGAGTGAGCGATTCAATAATTATTTCAATAC
TAAGTGTGTAAATATTTTCATCCTTCTTCATTCGTAGAATCTTTAGGCGCTTG
CCAAATTTTGTCACTTTTGTTAATTCATTATTAGTTATTAGTATGTTA ACTA
GTGTGGTAGCAATGTGTCAGTCAATAATCTTAGATCAGAGAAAGTATAGA
AGAGAGATTGAATTGATGCAGATTGAGAAGAATGAGATCGTCTGTATGGA

GTTATATGCAAGTTTACAGCGCAAACCTCGAACGCGATTTACATGGGATG
AGTATATAGAATATTTGAAGTCAGTAAACCCCCAGATAGTTAAGTTTGCA
CAAGCACAGATGGAAGAACATGAAGTGCGACACCAG

Αλληλουχία της περιοχής Α της P3N-PIPO ύστερα από προσθήκη μορίου αδεΐνης στο συντηρημένο μοτίβο GA₆ (1^η αντίδραση PCR):

CGCGGATCCATGGGTGTTCTAATGCATGCCCTGAACTTGGGTCCACTAG
ATCACCTTTCAGAGAAGGAGGATGCATAATGTCTGAGTCAGCAGCACTAA
AACTGCTTTTAAAGGGAATTTTAGACCTAAGGTGATGAGACAGTTGCTGT
TGGATGAACCTTACCTGTTGATTCTATCAATATTATCTCCTGGCATTCTGAT
GGCTATGTATAATAATGGGATTTTGAACCTGCGGTGAGGTTGTGGATTAA
TGAGAAACAATCCATAGCCTTAATAGCATCGTTGCTGTCAGCTTTAGCTCT
ACGAGTGTCAGCAGCAGAAACACTCATCGCACAGAGGATCATAATCGATG
CTGCAGCCACAGATCTCCTTGATGCTACGTGTGATGGGTCAACCTATATC
TAACGTATCCCCTGCACTGATGGTGTGCAAGTTGTCAAGAATAGAAAT
GAGTGCGATGATACCTTATTTAAGGCGGGCTTTCAAGTTACAGCACGAG
TGTCGTACAGATTATGGAAAAAAAATTATCTAGAT

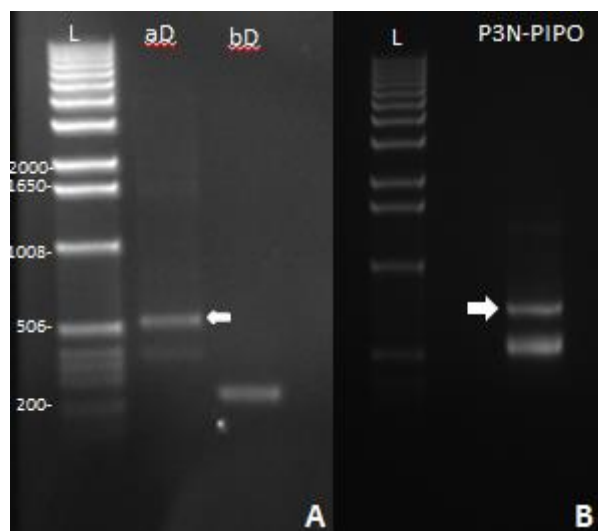
Αλληλουχία της περιοχής Β της P3N-PIPO ύστερα από προσθήκη μορίου αδεΐνης στο συντηρημένο μοτίβο GA₆ (2^η αντίδραση PCR):

TACAGATTATGGAAAAAAAATTATCTAGATCTCTTGGACGATGCTTGGAG
AGATTTAACTTGGCGAGAAAAATTGTCCGCAACATGGCATTTCATACAGAG
CAAGACGCTATATCACTCGGTCTATAAAACCCACAGGAAAGGCAGATTTG
AAAGGGTTATACAACATATCACCACAAGCATTCTTGGGTCAAAGCGTTCA
GAAGGTCAAAAACACTACTTCAGGTTTGAGTGAGGTACCGG

Αλληλουχία της P3N-PIPO ύστερα από προσθήκη μορίου αδεΐνης στο συντηρημένο μοτίβο GA₆, χρησιμοποιώντας τις περιοχές Α και Β των παραπάνω αντιδράσεων ως εκμαγείο για την σύνθεσή της.

CGCGGATCCATGGGTGTTCTAATGCATGCCCTGAACTTGGGTCCACTAG
ATCACCTTTCAGAGAAGGAGGATGCATAATGTCTGAGTCAGCAGCACTAA

AACTGCTTTTAAAGGGAATTTTATAGACCTAAGGTGATGAGACAGTTGCTGT
TGGATGAACCTTACCTGTTGATTCTATCAATATTATCTCCTGGCATTCTGAT
GGCTATGTATAATAATGGGATTTTGAACCTTGCGGTGAGGTTGTGGATTAA
TGAGAAACAATCCATAGCCTTAATAGCATCGTTGCTGTCAGCTTTAGCTCT
ACGAGTGTCAGCAGCAGAAACACTCATCGCACAGAGGATCATAATCGATG
CTGCAGCCACAGATCTCCTTGATGCTACGTGTGATGGGTTCAACCTATATC
TAACGTATCCCCTGCACTGATGGTGTGCAAGTTGTCAAGAATAGAAAT
GAGTGCGATGATACCTTATTTAAGGCGGGCTTTTCAAGTTACAGCACGAG
TGTCGTACAGATTATGGAAAAAAAAATTATCTAGATCTCTTGGACGATGCTT
GGAGAGATTTAACTTGGCGAGAAAAATTGTCCGCAACATGGCATTTCATAC
AGAGCAAGACGCTATATCACTCGGTCTATAAAACCCACAGGAAAGGCAG
ATTTGAAAGGGTTATACAACATATCACCACAAGCATTCTTGGGTCAAAGC
GTTTCAGAAGGTCAAAAACACTACTTCAGGTTTGAGTGAGGTACCGG



Εικόνα 3.9 Απεικόνιση πηγματος αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των τριών αντιδράσεων PCR, που πραγματοποιήθηκαν για την προσθήκη ενός επιπλέον μορίου αδενίνης στο συντηρημένο μοτίβο GA₆ της ιϊκής πρωτεΐνης P3 του PVY, προς σχηματισμό μετασχηματισμένου ιϊκού φορέα, ο οποίος θα έχει την ικανότητα παραγωγής αποκλειστικά της πρωτεΐνης P3N-PIPO. A) aD (Περιοχή A της P3N-PIPO, 541 bp), bD (Περιοχή B της P3N-PIPO, 241 bp), και B) P3N-PIPO μετά την προσθήκη ενός μορίου αδενίνης στο GA₆ (752 bp). (L) Κλίμακα μοριακών βαρών

DNA (1 Kb ladder, INVITROGEN™). Για τις παραπάνω απεικονίσεις χρησιμοποιήθηκε το 10% των προϊόντων των εκάστοτε αντιδράσεων.

Κεφάλαιο 4.

Συμπεράσματα-

Συζήτηση

Ο ιός Υ της πατάτας, είναι ο κύριος εκπρόσωπος του γένους *Potyvirus*, στο οποίο εμπεριέχονται ορισμένοι από τους πιο επικίνδυνους φυτικούς ιούς για την παγκόσμια αγροτική οικονομία (Kerlan, 2006). Το γονιδίωμά του παρουσιάζει τη μορφή μονόκλωνου (+)RNA, από το οποίο μεταφράζονται 10 πρωτεΐνες, ενώ μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης εντός της περιοχής, η οποία κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη P3, οδηγεί στην παραγωγή της πρωτεΐνης P3N-PIPO. Η γονιδιωματική περιοχή P3/ P3N-PIPO του PVY, κατέχει κύριο ρόλο στη προσαρμοστικότητα του ιού στην πιπεριά (Vassilakos *et al.*, 2016) ενώ η P3N-PIPO των *Potyvirus* μαζί με τις πρωτεΐνες CP και CI συμμετέχουν στην διακυτταρική μετακίνηση του ιού εντός ενός φυτού-ξενιστή (Wei *et al.*, 2010, Taiyun *et al.*, 2010). Επιπλέον, για το σκοπό αυτό, η P3N-PIPO συγγενικών του PVY ιών του γένους, αλληλοεπιδρά με τη φυτική πρωτεΐνη PCaP1 (Vijayapalani *et al.*, 2012). Η αλληλεπίδραση της P3N-PIPO με τη φυτική πρωτεΐνη PCaP1 την καθιστά υποψήφια ως έναν από τους φυτικούς παράγοντες που πιθανόν να συμμετέχουν στη προσαρμοστικότητά του PVY στην πιπεριά. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας, αποτέλεσε η φυτική πρωτεΐνη PCaP1 του είδους *C. annuum*, και συγκεκριμένα η διερεύνηση και επιβεβαίωση του ρόλου της στην ιϊκή μόλυνση του

PVY στην πιπεριά. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη την αναγκαιότητα της εμφάνισης μεταλλαγών στο γονιδίωμα ενός φυτού-ξενιστή προκειμένου μίας επιτυχημένης προσαρμογής ενός ιού σε αυτόν (Jones, 2009) εξετάστηκε η παρουσία διαφορών μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε τρεις διαφορετικές ποικιλίες πιπεριάς που επιδεικνύουν διαφορετική ανθεκτικότητα στον ιό. Τα πειράματα αποτελούν τμήμα μεγαλύτερης μελέτης που αφορά την εξέταση του συγκεκριμένου φυτικού παράγοντα ως εν δυνάμει στόχου προσαρμογής του PVY στη πιπεριά με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών γενικότερης αντιμετώπισης του ιών του γένους *Potyvirus*.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στη σίγηση του γονιδίου *PCaP1* της πιπεριάς μέσω VIGS. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε ο φορέας TRV-PpK20. Ωστόσο, έπρεπε να επιβεβαιωθεί στις παρούσες πειραματικές συνθήκες η αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου φορέα στην έκφραση επιλεγθέντων τμημάτων DNA τόσο για τη συγκεκριμένη όσο και για μελλοντικές μελέτες. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε ενσωματώνοντας στον TRV-PpK20 το γονίδιο της ιϊκής CP της απομόνωσης PVY-SON41 και μολύνοντας στη συνέχεια το φυτό-ξενιστή *N. Benthamiana*. Η έκφραση της ετερόλογης πρωτεΐνης (CP της PVY-SON41) επιβεβαιώθηκε μέσω της ανίχνευσής της με εμπορικά αντιδραστήρια ELISA για τον PVY.

Η σίγηση του *PCaP1* μέσω VIGS είχε σαν αποτέλεσμα την έκφρασή του σε επίπεδα 38% και 12% της αρχικής, στις 12 και 19 ημέρες αντίστοιχα, μετά τη μόλυνση με τον ιικό φορέα. Παρόλο ότι το χρονικό σημείο των 19 ημερών μετά τη μόλυνση εμφανίζεται ως καταλληλότερο για τις επικείμενες μολύνσεις με PVY-SON41 λόγω του υψηλότερου βαθμού σίγησης του *PCaP1*, τα φυτά βρίσκονται σε αναπτυξιακό στάδιο ακατάλληλο για επιτυχείς μηχανικές μολύνσεις. Συνεπώς, οι δοκιμές μόλυνσης με PVY-SON41 πραγματοποιήθηκαν 12 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιικό φορέα VIGS.

Κατά τη διερεύνηση της επίδρασης της πρωτεΐνης PCaP1 στη διασυστηματική μετακίνηση της απομόνωσης PVY-SON41, προέκυψε πως στα φυτά που είχαν μολυνθεί με τον μετασχηματισμένο ιικό φορέα TRV-PCaP1/VIGS, το γονίδιο της PCaP1 εκφραζόταν σε ποσοστό 18% του επιπέδου έκφρασης του γονιδίου των υγιών φυτών-μαρτύρων ή ήταν μη ανιχνεύσιμο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ποσοστό

έκφρασης του *PCaP1* στις σειρές των φυτών-μαρτύρων όπου δεν είχε επαχθεί η σίγηση του. Αναλυτικότερα, στη σειρά όπου τα φυτά είχαν μολυνθεί μόνο με PVY-SON41, η έκφραση του *PCaP1* ήταν τέσσερις φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τα υγιή, ενώ στις σειρές που είχαν μολυνθεί μόνο με TRV-PpK20 επτά φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα υγιή. Εντούτοις, και στις δύο περιπτώσεις η επαγωγή της έκφρασης του *PCaP1* δεν είχε επίδραση στη συγκέντρωση του PVY-SON41, καθώς δεν διέφερε με τη συγκέντρωση στα φυτά που είχαν μολυνθεί μόνο με PVY-SON41. Αντίθετα, στα φυτά όπου είχε πραγματοποιηθεί σίγηση του γονιδίου *PCaP1*, η συγκέντρωση του PVY-SON41 ήταν μειωμένη στο 6%, σε σχέση με την μονή μόλυνση με τον ιό. Συνεπώς, σε συμφωνία με προηγούμενες δημοσιεύσεις που αφορούσαν τον ρόλο της *PCaP1* στη μόλυνση με τους ιούς TuMV και TVBMV στους ξενιστές *Arabidopsis thaliana* και *Nicotiana benthamiana* (Vijayapalani *et al.*, 2012, Geng *et al.*, 2015), η ορθόλογη πρωτεΐνη της πιπεριάς είναι σημαντική για τη συγκέντρωση του PVY σε διασυστηματικό επίπεδο. Αντίστοιχη ήταν η σημασία της *PCaP1* για τη συγκέντρωση του PVY στα φύλλα που πραγματοποιήθηκε η μόλυνση (τοπικό επίπεδο). Πιο αναλυτικά, το ποσοστό έκφρασης του *PCaP1*, στα φυτά όπου είχε πραγματοποιηθεί σίγηση, υπολογίστηκε στο 11% του ποσοστού έκφρασης του γονιδίου στα φυτά που είχαν μολυνθεί μόνο με PVY-SON41, ενώ η συγκέντρωση του PVY υπολογίστηκε στο 74%. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση του PVY-SON41 με RT-qPCR στα φυτά που είχε επαχθεί η σίγηση της *PCaP1* επιβεβαίωσε τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν με σχετική ποσοτικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο *Ubi3*.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαφαίνεται σημαντικότερη επίδραση της *PCaP1* στη διασυστηματική μετακίνηση του PVY παρά στην τοπική, που όμως μπορεί να οφείλεται στα πολλαπλά σημεία εισόδου του PVY σε όλη την επιφάνεια του φύλλου του φυτού στο οποίο έγινε η μόλυνση. Παρόλα αυτά, η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης *PCaP1*, φαίνεται πως έχει άμεσο αντίκτυπο τόσο στην τοπική όσο και διασυστηματική μετακίνηση του PVY.

Όπως έχει προαναφερθεί, η προσαρμογή ενός ιού σε έναν νέο ξενιστή αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία. Ειδικότερα, στον PVY οι μεταλλαγές του γονιδιώματος του ξενιστή προκειμένου για την προσαρμογή του ιού σε αυτόν, έχουν ουσιαστικό ρόλο, καθώς στις πρωτεΐνες κίνησής του απουσιάζει η ικανότητα μεμβρανικής σύνδεσης (Niehl *et al.*, 2011). Για τον έλεγχο της επίπτωσης της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης *PCaP1* στην προσαρμογή του PVY, επιλέχθηκε η απομόνωση N605, ως

εκπρόσωπος της ομάδας N, μέλη της οποίας δεν μπορούν να μολύνουν την πιπεριά, ενώ από τη μεριά του φυτού-ξενιστή επιλέχθηκαν οι ποικιλίες Doux des Landes, Yolo Wonder και Phyto636. Αποτελέσματα από τις μολύνσεις των τριών αυτών ποικιλιών, έδειξαν πως, η απομόνωση N605, μπορεί και μολύνει τοπικά την ποικιλία Doux des Landes με δυνατότητα διασυστηματικής μόλυνσης, παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα τοπικής μόλυνσης της ποικιλίας Yolo Wonder και τέλος, δεν μπορεί να μολύνει την ποικιλία Phyto636. Από την αλληλούχιση του γονιδίου της πρωτεΐνης PCaP1 των τριών ποικιλιών προέκυψαν τέσσερις σημειακές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποικιλιών που αντιστοιχούν δύο αμινοξικές διαφοροποιήσεις. Η μεταβολή του ηλεκτρικού φορτίου, λόγω της αντικατάστασης του ουδέτερα φορτισμένου αμινοξέος αλανίνη με το αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ θρεονίνη, στη θέση 204 της πρωτεΐνης PCaP1 της ποικιλίας Doux des Landes, ίσως αποτελεί την αιτία της ενισχυμένης ικανότητας μόλυνσης της απομόνωσης N605 στην συγκεκριμένη ποικιλία λόγω των αλλαγών που επιφέρει στη δευτερογενή και τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, γεγονός που αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω μελέτης.

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην πρωτεΐνη PCaP1 η οποία βρέθηκε να συμμετέχει στην διαδικασία μόλυνσης του PVY στη πιπεριά. Επίσης στα πλαίσια μελλοντικών πειραμάτων συμπληρωματικότητας για τη διερεύνηση του τρόπου δράσης των πρωτεϊνών P3 και P3N-PIPO στην προσαρμοστικότητα του PVY στη πιπεριά πραγματοποιήθηκε σημειακή μετάλλαξη στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων που αντιστοιχεί στη γονιδιωματική περιοχή P3 της απομόνωσης PVY-SON41 και παράχθηκε DNA κλώνος της P3N-PIPO. Επιπλέον, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.4, έγινε προεργασία με στόχο τη μελέτη πιθανής συμπληρωματικής *in trans* δράσης των ιϊκών πρωτεϊνών P3 και P3N-PIPO, μέσω αγροεμποτισμού με *Agrobacterium tumefaciens*.

Κεφάλαιο 5.

Βιβλιογραφία

1. Ala-Poikela, M., Goytia, E., Haikonen, T., Rajamäki, M.L. and Valkonen, J.P.T., *Helper component proteinase of the genus potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif*. . Virol. , 2011. **85**: p. 6784–6794.
2. Atreya, C., Raccah, B. and Pirone, T., *A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus*. . Virology, 1990. **178**: p. 161–165.
3. Basso, J., Dallaire P., Charest P. J., Devantier Y. & Laliberte' J. F. , *Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA*. . J Gen Virol, 1994. **75**: p. 3157–3165.
4. Béclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P., and Vaucheret, H.,. *A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants*. Curr Biol 2002,**12**: 684-688.
5. Birnboim, H.C., Doly, J.. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res. 7 1979 **6**: 1513–23. doi:10.1093/nar/7.6.1513Nucleic
6. Brantley, J.D. and Hunt, A.G., *The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottle virus is an RNA-binding protein*. . J. Gen. Virol. , 1993. **74**: p. 1157–1162.
7. Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. and Baulcombe, D.C. *Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in*

- Nicotiana benthamiana*. EMBO J., 1998. **17**: p. 6739–6746.
8. Canto, T., Aranda, M.A., Fereres, A. *Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses*. Global Change Biology, 2009 **15**: 1884-1894.
 9. Carrington, J.C., Jensen, P.E. and Schaad, M.C. , *Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement*. . Plant J. , 1998. **14**: p. 393–400.
 10. Carrington, J.C. and Dougherty, W.G., *Small nuclear inclusion protein encoded by plant potyvirus genome is a protease*. J. Virol. , 1987. **61**: p. 2540–2548.
 11. Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J.L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A., Caranta, C.. *Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg*. The Plant Journal, 2008 **54**: 56-68.
 12. Chu, M., Lopez-Moya, J.J., Llave-Correas, C. and Pirone, T.P., *Two separate regions in the genome of the Tobacco etch virus contain determinants of the wilting response of Tabasco pepper*. . Mol. Plant–Microbe Interact., 1997. **10**: p. 472–480.
 13. Chung, B.Y., Miller, W.A., Atkins, J.F., Firth A.E., *An overlapping essential gene in the Potyviridae*. Proc Natl Acad Sci USA 2008. **105**: p. 5897 – 5902.
 14. Clark, M.F. and Adams A.N. , *Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses*. J. gen. Virol, 1976. **34**: p. 475-483.
 15. Costa, A.S. and Franco, C.M, *A VIRUS TECHNIQUE USEFUL TO DIAGNOSE FOLIAR DEFICIENCIES*. Plant Physiol, 1950: p. **625-8**.
 16. Cui, X., W.T., Chowda-Reddy, R. V., Sun, G. & Wang, A. *The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments*. Virology, 2010. **397**: p. 56-63.
 17. Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C.,. *An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus*. Cell 2000 **101**: 543-553.
 18. Deom, C.M., Murphy, J.F. and Paguio, O.R. , *Resistance to tobacco etch virus in Capsicum annuum: inhibition of virus RNA accumulation*. . Mol. Plant–Microbe Interact., 1997. **7**: p. 917–921.
 19. Ding, S.W., Li, H., Lua, R., Li, F., and Li, W.X.,. *RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals*. Virus Research 2004 **102**: 109-115.
 20. Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. and Carrington, J.C., *Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of Tobacco etch potyvirus*. . Virology, 1995. **206**: p. 1007–1016.
 21. Draper, M.D., Pasche, J.S. and Gudmestad, N.C. , *Factors influencing PVY development in three potato cultivars*. Am. J. Potato Res., 2002. **79**: p. 155–165.
 22. Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K.S., Robaglia, C. *The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses*. The Plant Journal 2002 **32**: 927-934.
 23. Edwardson, J.R., *Inclusion bodies*. Arch. Virol. , 1992. Suppl. **5**: p. 25–30.
 24. Edwardson, J.R. and Christie, R.G. , *Potyriviruses*. In: Florida Agricultural

- Experiment Station Monograph Series 18-II – Viruses Infecting Pepper and Other Solanaceous Crops (University of Florida, ed.). 1997: p. 424–524.*
25. Eiamtanastate, S., Juricek, M. and Yap, Y.K., *C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum*. *Virus Genes*, 2007. **35**: p. 611–617.
 26. Elena, S.F., Bedhomme, S., Carrasco, P., Cuevas, J. M., de la Iglesia, F., Lafforgue, G., Lalić, J., Prosper, A., Tromas, N., & Zwart, M. P. , *The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011. **24**: p. 287-293.
 27. Elena, S.F. and Rodrigo, G., *Towards an integrated molecular model of plant–virus interactions*. . *Curr. Opin. Virol.*, 2013. **2**: p. 719–724.
 28. Eskelin, K., H.A., Rantalainen, K. I. & Makinen, K. *Potyviral VPg enhances viral RNA Translation and inhibits reporter mRNA translation in planta*. *J Virol* 2011. **85**: p. 9210–9221.
 29. Fabre, F., Rousseau, E., Mailleret, L., Moury, B. *Epidemiological and evolutionary management of plant resistance: optimizing the deployment of cultivar mixtures in time and space in agricultural landscapes*. *Evolutionary Applications* 2015 **8**: 919-932.
 30. Fanigliulo, A., Comes, S., Pacella, R., Harrach, B., Martin, D.P. and Crescenzi, A., *Characterisation of Potato virus Y nnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a naturally occurring recombinant strain of PVY*. . *Arch. Virol.*, 2005. **150**: p. 709–720.
 31. Fereres, A, P.P., Gemenio, C., Ponz, F. *Transmission of Spanish pepper-PVY and potato-PVY isolates by aphid (Homoptera, Aphididae) vectors- Epidemiological implications*. *Environ Entomol*, 1993. **22**: p. 1260-1265.
 32. Furch, A.C., Z.M.R., Will, T., Hafke, J.B., van Bel, A.J. , *Remotecontrolled stop of phloem mass flow by biphasic occlusion in Cucurbita maxima*. *J Exp Bot* 2010. **61**: p. 3697–3708.
 33. Geng, C., Cong, Q.Q., Li, X.D., Mou, A.L., Gao, R., Liu, J.L., Tian, Y.P. *DEVELOPMENTALLY REGULATED PLASMA MEMBRANE PROTEIN of Nicotiana benthamiana contributes to potyvirus movement and transports to plasmodesmata via the early secretory pathway and the actomyosin system*. *Plant Physiology*, 2015 **167**: 394-410.
 34. Gergerich, R.C., and V. V. Dolja.. *Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor*. 2006 DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01
 35. Govier, D.A., Kassanis, B. and Pirone, T.P. , *Partial purification and characterization of Potato virus Y helper component*. . *Virology*, 1977. **78**: p. 306–314.
 36. Gulbahce, N., Yan, H., Dricot, A., Padi, M., Byrdsong, D., Franchi, R., Lee, D.S., Rozenblatt-Rosen, O., Mar, J.C., Calderwood, M.A., Baldwin, A., Zhao, B., Santhanam, B., Braun, P., Simonis, N., Huh, K.W., Hellner, K., Grace, M., Chen, A., Rubio, R., Marto, J.A., Christakis, N.A., Kieff, E., Roth, F.P., Roecklein-Canfield, J., Decaprio, J.A., Cusick, M.E., Quackenbush, J., Hill, D.E., Münger, K., Vidal, M., Barabási, A.L. *Viral perturbations of host networks reflect disease etiology*. *PLOS Computational Biology* 2012 **8**:e1002531.
 37. Harrison, B. D., and Robinson, D. J., *Tobraviruses*. In ‘‘The Plant Viruses’’ (M. H. V. van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat, Eds.), 1986, Vol. 2, pp. **339-369**. Plenum Press, New York.
 38. Harrison, B.D., Robinson, D.J., Mowat, W.P., and Duncan, G.H.,

- Comparison of nucleic acid hybridisation and other tests for detecting tobacco rattle virus in narcissus plants and potato tubers.* Ann Appl Biol 1983 **102**: 331-338.
39. Higuchi, R., Krummel, B., Saiki, R. *A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions.* Nucleic Acids Res. 16 1988 **15**: 7351–67
 40. Huang, Y.P., Huang, Y.W., Chen, I.H., Shenkwen, L.L., Hsu, Y.H., Tsai, C.H., *Plasma membrane-associated cation-binding protein 1-like protein negatively regulates intercellular movement of BaMV*, 2017, Journal of Experimental Botany doi:10.1093/jxb/erx307
 41. Ibaba, J.D., Gubba, A., *Diversity of Potato virus Y isolates infecting solanaceous vegetables in the province of KwaZulu-Natal in the Republic of South Africa.* Crop Prot, 2011, 30:1404–1408
 42. Ide, Y., N.N., Tomioka, R., Suito, M., Kamiya, T., et al. , *Molecular properties of a novel, hydrophilic cation-binding protein associated with the plasma membrane.* J Exp Bot 2007. **58**: p. 1173–1183.
 43. Ivanov, K.I., Eskelin, K., Lohmus, A. and Makinen, K., *Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection.* Journal of General Virology, 2014. **95**: p. 1415–1429.
 44. Jiang, J. and Laliberte, J.-F., *The genome-linked protein VPg of plant viruses—a protein with many partners.* Curr. Opin. Virol., 2011. **1**: p. 347–354.
 45. Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Jin, J., Li, D., Deng, C. and Wang, T. , *HC-Pro protein of Potato Virus Y can interact with three Arabidopsis 20S proteasome subunits in planta.* J. Virol. , 2007. **81**: p. 12 881–12 888.
 46. Jones, R.A.C. *Future scenarios for plant virus pathogens as climate change progresses* Advances in Virus Research 2016 **95**: 87-147.
 47. Jones, R.A.C., *Plant virus emergence and evolution: origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control.* Virus Research, 2009. **141**: p. 113-130.
 48. Jones, R.A.C., Barbetti, M.J. *Influence of climate change on plant disease infections and epidemics caused by viruses and bacteria.* CAB Reviews 2012 **7**: 1-32.
 49. Kang, B.C., Yeam, I., Jahn, M.M. *Genetics of plant virus resistance.* Annual Review of Phytopathology 2005 **43**: 581-621.
 50. Kerlan, C., *Potato virus Y.* Descriptions of Plant Viruses, 2006. **414**.
 51. King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* ; London; Waltham: Academic Press 2012.
 52. Lacroix, C., Glais, L., Verrier, J.L., Jacquot, E. *Effect of passage of a Potato virus Y isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene va2 on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2.* European Journal of Plant Pathology 2011 **130**: 259-269.
 53. Latorre, B.A., Flores, V. and Marholz, G. , *Effect of potato virus Y on growth, yield, and chemical composition of flue-cured tobacco in Chile.* Plant Dis. , 1984. **68**: p. 884-886.
 54. Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A., Carrington J.C. *Loss-of-susceptibility mutants of Arabidopsis thaliana reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection.* Current Biology 2002 **12**: 1046-1051.

55. Li, J., Wang, X., Qin, T., Zhang, Y., Liu, X., Sun, J., Zhou, Y., Zhu, L., Zhang, Z., Yuan, M, Mao, T. *MDP25, a novel calcium regulatory protein, mediates hypocotyl cell elongation by destabilizing cortical microtubules in Arabidopsis*. The Plant Cell 2011 **23**: 4411-4427.
56. Li, X.H., V.P., Olvera, R.E. & Carrington, J.C. , *Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein–protein interaction with VPg/proteinase (NIa)*. J Virol, 1997. **71**: p. 1598–1607.
57. Logan, D.C., Domergue, O., Teyssendier, de la Serve B., Rossignol, M. , *A new family of plasma membrane polypeptides differentially regulated during plant development*. Biochem Mol Biol Int, 1997. **43**: p. 1051–1062.
58. López-Moya, J.J., and García, J. A., *Potyvirus (Potyviridae)*. Encyclopedia of Virology, Second Edition. R. G. Webster and A. Granoff, eds. Academic Press Ltd., 1999 p. **1369-1375**
59. López-Moya, J.J., Wang, R.Y. and Pirone, T.P. , *Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids*. J. Gen. Virol., 1999. **80**: p. 3281–3288.
60. Luan, H., Shine, M.B., Cui, X., Chen, X., Ma, N., Kachroo, P., Zhi, H., Kachroo, A. *The potyviral P3 protein targets Eukaryotic Elongation Factor 1A to promote the Unfolded Protein Response and viral pathogenesis*. Plant Physiology 2016 **172**: 221-234.
61. Heinlein, M., *Plasmodesmata: channels for viruses on the move*. . Methods Mol. Biol. , 2015. **1217**: p. 25–52.
62. MacFarlane, A. S. and Popovich H.A. , *Efficient Expression of Foreign Proteins in Roots from Tobravirus Vectors*, Virology 2000 **267**, 29-35, doi:10.1006/viro.1999.0098
63. Margaritopoulos, J.T., Dovas, C.I., Gounaris, J., Skouras, P.J., Kanavaki, O.M., Katis-Tsitsipis, J.A. *Molecular analysis of the coat protein of Potato virus Y isolates in Greece suggests multiple introduction from different genetic pools*. J Phytopathol, 2010 **158**:73–80
64. Marin, M., and Ott, T., *Intrinsic disorder in plant proteins and phytopathogenic bacterial effectors*. . Chem Rev, 2014. **114**: p. 6912–6932.
65. Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H., Hataya, T. *A single amino acid change in viral genome-associated protein of Potato virus Y correlates with resistance breaking in “virgin A mutant” tobacco*. Phytopathology 1999 **89**:118 –123.
66. Maule, A.J., *Plasmodesmata: structure, function and biogenesis*. . Curr. Opin. Plant Biol., 2008. **11**: p. 680–686.
67. Merits, A., Guo, D.Y. and Saarma, M. , *VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner*. . J. Gen. Virol. , 1998. **79**: p. 3123–3127.
68. Merits, A., Guo, D.Y., Jarvekul, L. & Saarma, M., *Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex*. Virology, 1999. **263**: p. 15–22.
69. Merits, A., Rajamaki, M. L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Makelainen, K., Valkonen, J. P. & Saarma, M., *Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells*. . J Gen Virol 2002. **83**: p. 1211–1221.
70. Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., and Vaucheret, H.,. *Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1)*

- mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance.* Plant Cell 2002 **14**: 629-639.
71. Moury, B., *A new lineage sheds light on the evolutionary history of Potato virus Y.* Mol Plant Pathol, 2010. **11**: p. 161–168.
 72. Moury, B., Janzac, B., Ruellan, Y., Simon, V., Ben Khalifa, M., Fakhfakh, H., Fabre, F., Palloix, A. *Interaction patterns between potato virus Y and eIF4E-mediated recessive resistance in the Solanaceae.* Journal of Virology 2014 **88**: 9799-9807.
 73. Moury, B., Simon, V., Faure, C., Svanella-Dumas, L., Marais, A., Candresse, T. *Host Groups of Potato virus Y: Vanishing Barriers.* In: Lacomme, C., Glais, L. Bellstedt, D., Dupuis, B., Karasev, A., Jacquot, E. (eds) *Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management.* (2017) Springer, Cham
 74. Moury, B. and Simon, V., *dN/dS-based methods detect positive selection linked to trade-offs between different fitness traits in the coat protein of Potato virus Y.* Mol. Biol. Evol. , 2011. **28**: p. 2707–2717.
 75. Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., Jacquemond, M. *Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in Capsicum annuum and Lycopersicon hirsutum.* Molecular Plant-Microbe Interactions 2004 **17**: 322-329.
 76. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology. 1986 **51**: 263-73.
 77. Murphy, J.F., Rhoads, R.E., Hunt, A.G. and Shaw, J.G. , *The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase.* . Virology, 1990. **178**: p. 285–288.
 78. Nagasaki, N., Tomioka, R., Maeshima, M. , *A hydrophilic cation-binding protein of Arabidopsis thaliana, AtPCaP1, is localized to plasma membrane via N-myristoylation and interacts with calmodulin and the phosphatidylinositol phosphates PtdIns(3,4,5)P(3) and PtdIns(3,5)P(2).* FEBS J., 2008. **275**: p. 2267–2282.
 79. Nagata, C., Miwa, C., Tanaka, N., Kato, M., Suito, M., Tsuchihira, A., Sato, Y., Segami, S., Maeshima, M. *A novel-type phosphatidylinositol phosphate-interactive, Ca-binding protein PCaP1 in Arabidopsis thaliana: stable association with plasma membrane and partial involvement in stomata closure.* Journal of Plant Research 2016 **129**: 539-550.
 80. Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R.,. *Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans.* Plant Cell 1990 **2**: 279-289.
 81. Navratil, V., de Chassey, B., Combe, C.R., Lotteau, V. *When the human viral infectome and diseasome networks collide: towards a systems biology platform for the aetiology of human diseases.* BMC Systemic Biology, 2011 **5**: 13.
 82. Niehl, A., Heinlein, M., *Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata.* Protoplasma, 2011. **248**:p. 75–99.
 83. Olsper, A., Chung, B.Y.-W., Atkins, J.F. et al, *Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae.* EMBO Rep, 2015. **16**: p. 995 – 1004.
 84. Ostfeld, R.S., Keesing, F. *Effects of host diversity on infectious disease.*

- Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 2012 **43**:157-182.
85. Otulak, K., Garbaczewska, G., *Cellular localisation of calcium ions during potato hypersensitive response to Potato virus Y*. . Micron, 2011. **22**: p. 381–391.
 86. Pogue, G.P., Lindbo J.A., Garger S.J., and Fitzmaurice W.P., *Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture*. Annual Review of Phytopathology, 2002. **40**: p. 45-74.
 87. Quenouille, J., Vassilakos, N., Benoit M. , *Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity* Mol. Plant Path. , 2013. **14**: p. 439-452.
 88. Rantalainen, K.I., Eskelin, K., Tompa, P. and Makinen, K. , *Structural flexibility allows the functional diversity of potyvirus genome-linked protein VPg*. J. Virol. , 2011. **85**(2449–2457).
 89. Ratcliff, F., Harrison, B.D., and Baulcombe, D.C.,. *A similarity between viral defense and gene silencing in plants*. Science 1997 **276**: 1558-1560.
 90. Revers, F. and García, J.A., *Molecular biology of potyviruses*. Adv Virus Res 2015. **92**: p. 101 – 199.
 91. Robaglia, C. & Caranta, C., *Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection*. Trends Plant Sci, 2006. **11**: p. 40–45.
 92. Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. and Lucas, W.J. , *Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins*. Virology, 1997. **237**: p. 283–295.
 93. Ruffel, S., Gallois, J.L., Lesage, M.L., Caranta, C. *The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene*. Molecular Genetics and Genomics 2002 **274**: 346-353.
 94. Sacristán, S., Fraile, A., Malpica, J. M., & García-Arenal, F. , *An analysis of host adaptation and its relationship with virulence in Cucumber mosaic virus*. Phytopathology, 2005. **95**: p. 827-833.
 95. Sáenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. and García, J.A. , *Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses*. . J. Virol. , 2002. **76**: p. 1922–1931.
 96. Sanderfoot, A.A., Assaad, F.F., Raikhel, N.V. *The Arabidopsis Genome. An abundance of Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Adaptor protein receptors*. Plant Physiology 2000 **124**: 1558-1569.
 97. Schaad, M.C., Jensen, P.E. and Carrington, J.C., *Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein*. EMBO J. , 1997. **16**: p. 4049–4059.
 98. Scholthof, K.-B.G., 1898 – *the beginning of virology...time marches on*. . The Plant Health Instructor., 2001. DOI:10.1094/PHI-I-0129-01.
 99. Scholthof, K.B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G.D. *Top 10 plant viruses in molecular plant pathology*. Molecular Plant Pathology 2011 **12**: 938-954.
 100. Song, P., Zhi, H., Wu, B., Cui, X., Chen, X. *Soybean Golgi SNARE 12 protein interacts with Soybean mosaic virus encoded P3N-PIPO protein*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2016 **478**: 1503-1508.
 101. Ueki, S., S.R., Natale, D.M., Citovsky, V. *ANK, a host cytoplasmic receptor for the Tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein, facilitates intercellular transport through plasmodesmata*. 2010. PLoS Pathog 6: e1001201.

102. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L., Bernardi, F. *Potyvirus proteins: a wealth of functions*. Virus Research 2001 **74**: 157-175.
103. Varrelmann, M., Maiss, E., Pilot, R. and Palkovics, L. , *Use of pentapeptideinsertion scanning mutagenesis for functional mapping of the plum pox virus helper component proteinase suppressor of gene silencing*. J. Gen. Virol. , 2007. **88**: p. 1005–1015.
104. Vassilakos, N., Simon, V., Tzima, A., Johansen, E., Moury, B., *Genetic Determinism and Evolutionary Reconstruction of a Host Jump in Plant Virus*, *Molecular Biology and Evolution*, 2016, **33**:2:541-553
105. Vassilakos, N., Vellios, E.K., Brown, E.C., Brown, D.J.F., MacFarlane, S.A.,. *The Tobravirus 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes*. Virology 2001 **279**: 478-487.
106. van Kammen, A., Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. Trends Plant Sci, 1997. 2: p. 409-411.
107. Verchot, J., Koonin, E.V. and Carrington, J.C. , *The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a 3rd virus-encoded proteinase*. . Virology, 1991. **185**: p. 527–535.
108. Verchot, J. and Carrington, J.C., *Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification*. . J. Virol. , 1995. **69**: p. 3668–3674.
109. Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., Miller, W.A. *Interaction of the trans-frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates Potyvirus movement*. 2012 PLOS Pathogen 8: e1002639.
110. Voinnet, O., Pinto, Y.M., and Baulcombe, D.C., *Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants*. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 **96**: 14147-14152.
111. Walmsley, A.M. and Arntzen, C.J. *Plants for delivery of edible vaccines*. Current Opinion in Biotechnology 2000. **11**: p. 126-129.
112. Wang, X., Ullah, Z. & Grumet, R. , *Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein*. Virology, 2000. **275**: p. 433–443.
113. Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington J.C., Wang A. *Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO*. PLOS Pathogen 2010. **6**: e1000962.
114. Wei, T. and Wang, A., *Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner*. . J. Virol. , 2008. **82**: p. 12 252–12 264.
115. White, K.A., *The polymerase slips and PIPO exists* EMBO Rep 2015. **9**: p. 16(8):885-6.
116. Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M.G. & Laliberte', J.F., *Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translationa leukaryotic initiation factor (iso) 4E of Arabidopsis thaliana using the yeast two-hybrid system*. . Virology, 1997. **234**: p. 84–92.